

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**EFFETS DE L'INTERLEUKINE-15 ET DE L'INTERLEUKINE-21 SUR LES
NEUTROPHILES**

Par
Martin Pelletier

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Mathieu Cellier
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Paul H. Naccache
Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie
Centre hospitalier de l'Université Laval

Examineur externe

János G. Filep
Département de médecine
Hopital Maisonneuve-Rosemont
Université de Montréal

Directeur de recherche

Denis Girard
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine pro-inflammatoire pouvant activer les fonctions des neutrophiles grâce aux trois chaînes du récepteur à l'IL-15 présentes à leur surface, c'est-à-dire l'IL-15R α , l'IL-2/15R β (CD122) et la chaîne commune γ c (CD132) partagée par le récepteur de l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21. L'IL-15 retarde également leur apoptose spontanée par un mécanisme encore non élucidé. L'interleukine-21 (IL-21), quant à elle, est une cytokine récemment découverte dont la séquence primaire s'apparente à l'IL-15. L'IL-21 active plusieurs types cellulaires suite à sa liaison à son récepteur composé d'une chaîne spécifique IL-21R α et de CD132. Aucune étude n'a toutefois démontré la présence de l'IL-21R α à la surface des neutrophiles, ni un effet de cette cytokine sur leurs fonctions. Des concentrations élevées d'IL-15 et d'IL-21 ont été détectées chez des patients atteints de l'arthrite rhumatoïde et de la sarcoïdose, maladies où le neutrophile joue un rôle important dans la destruction tissulaire. Ceci suggère une implication de l'IL-15 et de l'IL-21 dans l'activation inappropriée des neutrophiles et le développement de ces maladies.

Le but de ce travail était d'évaluer les effets pro-inflammatoires potentiels de l'IL-15 et de l'IL-21 *in vitro* et *in vivo* ainsi que les effets de ces cytokines sur les fonctions des neutrophiles afin de mieux comprendre le rôle de ces cellules dans les maladies inflammatoires. Plus spécifiquement, nous avons évalué les mécanismes impliqués dans le retard d'apoptose des neutrophiles induit par l'IL-15, ainsi que les effets de l'IL-15 sur l'adhésion des neutrophiles et leur recrutement *in vivo* dans le modèle inflammatoire murin de la poche d'air. Nous avons également vérifié si un agent thérapeutique, la lectine de plante *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I), pouvait moduler les réponses des neutrophiles induites par l'IL-15. Dans un deuxième temps, nous avons vérifié si l'IL-21 possède un potentiel pro-inflammatoire *in vivo* et si l'IL-21 est un agoniste des neutrophiles pouvant activer leurs fonctions et moduler leur apoptose spontanée.

Dans le premier volet de cette recherche, nous avons démontré que la VAA-I peut inhiber certaines fonctions des neutrophiles induites par l'IL-15. De plus, nous montrons que

l'IL-15 retarde l'apoptose des neutrophiles en augmentant la phosphorylation de différentes protéines, dont Jak-2, ERK-1/2 et p38 MAPK, tout en augmentant l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1. L'activation des neutrophiles par l'IL-15 se traduit également par une augmentation de l'expression des intégrines CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles. De plus, nous démontrons que l'IL-15 augmente l'adhésion des neutrophiles aux cellules épithéliales pulmonaires A549. L'injection d'IL-15 dans le modèle murin de la poche d'air entraîne majoritairement le recrutement de neutrophiles. Nos résultats suggèrent que l'IL-15 peut attirer les neutrophiles au site inflammatoire, retarder leur niveau d'apoptose basal par différents mécanismes et augmenter l'expression des intégrines indispensables à l'adhésion aux cellules environnantes.

Dans le deuxième volet de cette recherche, nous avons démontré que l'IL-21 induit à la fois le recrutement transitoire de neutrophiles et de monocytes/macrophages. Nous démontrons que les cellules pro-myélocytes HL-60 expriment l'IL-21R α , qui disparaît lors de leur différenciation en neutrophiles, et que l'IL-21R α est absente chez les neutrophiles. De plus, l'IL-21 ne module aucune des fonctions étudiées des neutrophiles et n'affecte pas leur apoptose spontanée. Ceci suggère que l'expression de la chaîne CD132 est insuffisante à elle seule pour permettre la modulation des fonctions des neutrophiles par l'IL-21. Les monocytes et les macrophages expriment quant à eux les deux chaînes de l'IL-21R et les macrophages stimulés avec l'IL-21 sécrètent du CXCL8/IL-8, un puissant chimioattractant des neutrophiles. Nous proposons alors que l'IL-21 puisse agir indirectement sur les fonctions des neutrophiles par l'activation des monocytes et des macrophages (et possiblement des cellules résidentes) au site inflammatoire avec pour conséquence la production de chimiokines agissant directement sur les neutrophiles.

La présence de l'IL-21R α chez les cellules immatures HL-60 nous a incité à envisager un rôle de l'IL-21 dans la prolifération et la survie de cellules immatures. Nous avons donc isolé les cellules de la moelle osseuse de la souris afin de les stimuler avec l'IL-21 et l'IL-15. Nous avons noté que l'IL-15 retarde l'apoptose et entraîne la prolifération des

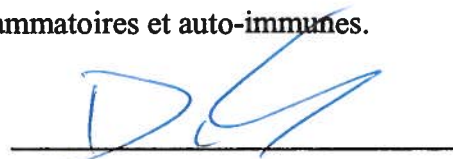
cellules de la moelle osseuse par un mécanisme impliquant le facteur de transcription NF- κ B. Par opposition, l'IL-21 exerce seulement un effet anti-apoptotique sur ces mêmes cellules. Ces effets de l'IL-15 et de IL-21 sont observés principalement sur la population lymphoïde de la moelle osseuse. Nous avons également noté l'expression différentielle de chacun des récepteurs, IL-15R α et IL-21R α , à la surface ces cellules lymphoïdes (CD11b⁻) et myéloïdes (CD11b⁺). Nos résultats suggèrent que l'IL-15 est à la fois un facteur de croissance et de survie des cellules lymphoïdes de la moelle osseuse alors que l'IL-21 est plutôt un facteur anti-apoptotique de ces cellules. Nous avons également observé que l'IL-21R α n'est pas exprimé à la surface des cellules myéloïdes, ce qui semble indiquer que cette chaîne soit essentielle pour permettre la modulation de la survie des cellules de la moelle osseuse.

Nous pouvons conclure que l'expression des trois chaînes du récepteur à l'IL-15 permet la modulation de différentes fonctions des neutrophiles. Nos résultats suggèrent que l'IL-15 peut influencer directement le sort des neutrophiles dans certaines maladies en impliquant leur recrutement au site inflammatoire, l'augmentation de leur adhésion aux cellules environnantes et la modulation de leur apoptose spontanée. Ces résultats concordent avec la détection de concentrations élevées d'IL-15 et la persistance des neutrophiles dans les maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde et la sarcoïdose. Il est toutefois possible de moduler l'activation des neutrophiles par l'IL-15 en utilisant la VAA-I. Par contre, l'expression de CD132 à la surface des neutrophiles est insuffisante pour que l'IL-21 module directement les réponses de ces cellules. L'IL-21 agirait indirectement sur le recrutement des neutrophiles en augmentant la sécrétion de chimiokines par les macrophages. La caractérisation des interactions entre les neutrophiles, l'IL-15 et l'IL-21 permet une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant leur activation et permettra le développement d'outils thérapeutiques appropriés pour le traitement de maladies inflammatoires et auto-immunes.



Martin Pelletier

Étudiant



Dr. Denis Girard

Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le docteur Denis Girard, pour sa confiance, son dynamisme, sa bonne humeur et son encadrement. Mes dernières années à ses côtés furent très enrichissantes, tant au niveau scientifique que personnel.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire qui ont partagé mes journées. Merci à Valérie Lavastre, Claude Ratthé, Éliane Moisan, François Binet, Hélène Cavalli et Sonia Chiasson. Je remercie particulièrement Amélie Bouchard pour son aide précieuse en laboratoire et son dévouement jour après jour. Sa présence à mes côtés fut déterminante dans la réussite de mon doctorat.

Merci à Stéphane Pillet, Michele D'Elia et Philippe Desharnais pour vos conversations scientifiques (et moins scientifiques!) ayant occupé mes temps d'attente et mes moments libres pendant toutes ces années. Votre amitié me sera toujours précieuse... Merci aussi à tous les gens que j'ai côtoyé au site Pointe-Claire de l'INRS-Institut Armand-Frappier, plus particulièrement Julie Patenaude, Geneviève Dupéré-Minier, Isabelle Plante, Sophie Tessier, Claudine Hamelin, Guylaine Lassonde, Julie Dufresne, Marlène Fortier, Jacques Lussier, Daniel Venne, Louis Sénécal, Josée Labonne, Jocelyne Ash et Francine Leclerc.

Merci à mes parents, Robert et Isabel, à ma sœur, Annick, ainsi que son copain, Stéphan Beauregard, de m'avoir constamment encouragé dans mes études et de m'avoir aidé dans mes moments les plus difficiles.

Un merci très spécial à Ingrid Saba. Son amour, son amitié et ses encouragements constants ont été une source d'inspiration inépuisable lors de la dernière année de mon doctorat.

Et finalement, merci aux organismes subventionnaires des IRSC et du FCAR-FRSQ pour les bourses de niveau doctorat qu'ils m'ont octroyées.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
REMERCIEMENTS	VII
TABLE DES MATIÈRES.....	IX
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. LES CYTOKINES À CHAÎNE GAMMA COMMUNE.....	5
1.1 PLÉIOTROPIE ET REDONDANCE.....	6
1.2 LA VOIE DE SIGNALISATION JAK-STAT	7
1.3 L'IMPORTANCE DE LA CHAÎNE CD132 : L'EXEMPLE DU CAS DES ENFANTS-BULLES	7
2. L'INTERLEUKINE-15	9
2.1 DÉCOUVERTE DE LA CYTOKINE.....	9
2.2 CARACTÉRISTIQUES DE L'IL-15	9
2.2.1 Gène.....	9
2.2.2 Structure	10
2.2.3 Distribution.....	10
2.2.4 Mécanismes de régulation	11
2.2.5 Expression membranaire	12
2.2.5.1 Signalisation inverse	12
2.3 DÉCOUVERTE DU RÉCEPTEUR.....	13
2.4 CARACTÉRISTIQUES DE L'IL-15R	14
2.4.1 Gène.....	14
2.4.2 Structure	14
2.4.3 Distribution.....	15
2.4.4 Affinité de l'IL-15 pour son récepteur.....	15
2.4.5 La trans-présentation : propriété de l'IL-15R α	16
2.5 EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-15	18
2.5.1 Développement du système immunitaire.....	18
2.5.1.1 Études <i>in vivo</i>	18
2.5.1.2 Études <i>in vitro</i>	18
2.5.2 Cellules du système immunitaire.....	20
2.5.2.1 Cellules NK.....	22
2.5.2.2 Lymphocytes T.....	22
2.5.2.3 Lymphocytes B	23
2.5.2.4 Monocytes/macrophages et cellules dendritiques.....	24
2.5.2.5 Mastocytes	24
2.5.3 Inhibiteur général de l'apoptose	25
2.5.4 Effets de l'IL-15 sur les cellules et tissus d'origine non hématopoïétique	25
2.6 UTILISATIONS THÉRAPEUTIQUES POSSIBLES DE L'IL-15	26
2.6.1 Adjuvant dans le traitement des infections bactériennes et virales.....	26
2.6.2 Applications anti-tumorales.....	26

2.7	RÔLE DE L'IL-15 DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES, AUTO-IMMUNES ET LE CANCER	27
2.7.1	Arthrite rhumatoïde	27
2.7.1.1	Détection de l'IL-15	28
2.7.1.2	Effets de l'IL-15	28
2.7.1.3	Régulation de l'IL-15 pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde	29
2.7.2	Maladies pulmonaires	30
2.7.2.1	Sarcoïdose	30
2.7.2.2	Bronchite, asthme et autres	30
2.7.3	Maladies inflammatoire chroniques de l'intestin	31
2.7.4	Autres maladies inflammatoire et auto-immunes	31
2.7.5	Cancers	32
3.	L'INTERLEUKINE-21	33
3.1	DÉCOUVERTE DE LA CYTOKINE ET DE SON RÉCEPTEUR	33
3.2	CARACTÉRISTIQUES DE L'IL-21	33
3.2.1	Gène	33
3.2.2	Structure	34
3.2.3	Distribution	34
3.2.4	Mécanismes de régulation	34
3.3	CARACTÉRISTIQUES DE L'IL-21R	35
3.3.1	Gène	35
3.3.2	Structure	35
3.3.3	Distribution	35
3.3.4	Liaison de l'IL-21 à son récepteur	36
3.4	EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-21	36
3.4.1	Développement du système immunitaire	36
3.4.2	Cellules du système immunitaire	36
3.4.2.1	Cellules NK	39
3.4.2.2	Lymphocytes T	39
3.4.2.3	Lymphocytes B	40
3.4.2.4	Cellules dendritiques	41
3.4.2.5	Cellules myéloïdes	41
3.5	UTILISATIONS THÉRAPEUTIQUES POSSIBLES DE L'IL-21	42
3.5.1	Traitement des allergies et de l'asthme	42
3.5.2	Applications anti-tumorales	42
3.6	RÔLE DE L'IL-21 DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES, AUTO-IMMUNES ET LE CANCER	43
3.6.1	Arthrite rhumatoïde	43
3.6.2	Sclérose systémique	43
3.6.3	Maladie de Crohn	44
3.6.4	Diabète auto-immun	44
3.6.5	Cancers	45
4.	LES NEUTROPHILES	46
4.1	LE DÉVELOPPEMENT DES NEUTROPHILES	46
4.1.1	L'hématopoïèse	46
4.1.2	La production de neutrophiles	47
4.1.3	Les étapes de maturation des neutrophiles	47
4.2	LES FONCTIONS DES NEUTROPHILES	48
4.2.1	La chimiotaxie	48
4.2.2	La phagocytose	50
4.2.3	La synthèse de cytokines et de chimiokines	52
4.3	LA LIGNÉE CELLULAIRE HL-60 : UN MODÈLE POUR L'ÉTUDE DE LA MYÉLOPOÏÈSE	54
4.4	LE MODÈLE INFLAMMATOIRE DE LA POCHE D'AIR : ÉTUDE DE LA CHIMIOTAXIE <i>IN VIVO</i>	56
4.5	L'APOPTOSE DES NEUTROPHILES	58
4.5.1	Caractéristiques des neutrophiles apoptotiques	58
4.5.2	Régulation	59
4.5.2.1	Les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2	59

4.5.2.2	Les caspases	60
4.5.2.3	Les inhibiteurs de l'apoptose.....	61
4.5.2.4	Les inducteurs de l'apoptose	63
4.5.3	La reconnaissance des neutrophiles par les macrophages	64
4.6	PATHOLOGIES ASSOCIÉES AUX NEUTROPHILES.....	65
4.6.1	L'arthrite rhumatoïde.....	66
4.6.2	Sarcoïdose et autres maladies respiratoires	68
4.6.3	Le rôle des neutrophiles dans les réactions antitumorales	69
4.7	LES NEUTROPHILES ET LES CYTOKINES À CHAÎNE GAMMA COMMUNE.....	70
4.7.1	Interleukine-2	70
4.7.2	Interleukine-4	71
4.7.3	Interleukine-7	72
4.7.4	Interleukine-9	73
4.7.5	Interleukine-15	74
4.7.6	Interleukine-21	75
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....		77
INTERACTION NEUTROPHILES/IL-15.....		79
INTERACTION NEUTROPHILES/IL-21.....		80
CHAPITRE 3 : ARTICLE I.....		81
MISE EN CONTEXTE		83
RÉSUMÉ FRANÇAIS		84
CONTRIBUTION DES AUTEURS		85
MODULATION OF INTERLEUKIN-15-INDUCED HUMAN NEUTROPHIL RESPONSES BY THE PLANT LECTIN VISCUM ALBUM AGGLUTININ-I.....		86
CHAPITRE 4 : ARTICLE II.....		95
MISE EN CONTEXTE		97
RÉSUMÉ FRANÇAIS		99
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS.....		100
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		101
CHAPITRE 5 : ARTICLE III		111
MISE EN CONTEXTE		113
RÉSUMÉ FRANÇAIS		115
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS.....		117
INTERLEUKIN-15 INCREASES NEUTROPHIL ADHESION ONTO HUMAN RESPIRATORY EPITHELIAL A549 CELLS AND ATTRACTS NEUTROPHILS IN VIVO		118
CHAPITRE 6 : ARTICLE IV		131
MISE EN CONTEXTE		133
RÉSUMÉ FRANÇAIS		135
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS.....		137
<i>IN VIVO</i> AND <i>IN VITRO</i> ROLES OF IL-21 IN INFLAMMATION.....		138
CHAPITRE 7 : ARTICLE V.....		149
MISE EN CONTEXTE		151
RÉSUMÉ FRANÇAIS		153
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS.....		155
DIFFERENTIAL EFFECTS OF IL-15 AND IL-21 IN MYELOID (CD11b ⁺) AND LYMPHOID (CD11b ⁻) BONE MARROW CELLS		156

CHAPITRE 8 : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	197
INTERACTIONS NEUTROPHILES/IL-15.....	199
INTERACTIONS NEUTROPHILES/IL-21.....	211
PERSPECTIVES.....	217
CONCLUSION.....	219
BIBLIOGRAPHIE.....	221
ANNEXE.....	291

Liste des figures et des tableaux

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATISÉE DES RÉCEPTEURS DE CYTOKINES À CHAÎNE γ C.....	6
FIGURE 2 : PHÉNOMÈNE DE SIGNALISATION INVERSE INDUITE PAR L'IL-15 DANS LES MONOCYTES.....	13
FIGURE 3 : SCHÉMATISATION DE LA TRANS-PRÉSENTATION DE L'IL-15 PAR L'IL-15R α	17
FIGURE 4 : EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-15 : RÔLE DANS L'IMMUNITÉ INNÉE ET ACQUISE.....	21
FIGURE 5 : EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-21 : RÉGULATEUR-CLÉ DANS LA TRANSITION ENTRE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE ET ACQUISE	38
FIGURE 6 : REPRÉSENTATION DU CYCLE BIOLOGIQUE DES NEUTROPHILES.....	49
FIGURE 7 : ÉTAPES DE LA MIGRATION DES NEUTROPHILES DANS LES TISSUS.....	51
FIGURE 8 : SCHÉMATISATION DE L'ACTIVATION DE L'ARSENAL BACTÉRICIDE DU NEUTROPHILE LORS DE LA PHAGOCYTOSE	53
FIGURE 9 : MODE D'ACTION POTENTIEL DU RECRUTEMENT DES NEUTROPHILES INDUIT PAR L'IL-15 DANS LE MODÈLE DE LA POCHE D'AIR.....	202
FIGURE 10 : MODÈLE DES DIFFÉRENTES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVÉES PAR L'IL-15 DANS LES NEUTROPHILES.....	208
FIGURE 11 : MODE D'ACTION POTENTIEL DU RECRUTEMENT DES NEUTROPHILES ET DES MONOCYTES/MACROPHAGES INDUIT PAR L'IL-21 DANS LE MODÈLE DE LA POCHE D'AIR	213
FIGURE 12 : L'IL-4, CONTRAIREMENT AUX IL-2, -7 ET -9, INDUIT LA PHOSPHORYLATION DE JAK-2 DANS LES NEUTROPHILES HUMAINS.	293
FIGURE 13 : L'EXPRESSION DE L'IL-21 PAR LES CELLULES HL-60 EST DIMINUÉE LORS DE LEUR DIFFÉRENCIATION EN NEUTROPHILES.....	295
FIGURE 14 : EFFET COMBINÉ DE L'IL-15 ET DE L'IL-21 SUR L'ACTIVITÉ MITOCHONDRIALE DES CELLULES DE LA MOELLE OSSEUSE.....	297
TABLEAU I : PHÉNOTYPE DES SOURIS TRANSGÉNIQUES SUREXPRESSANT L'IL-15 OU DÉFICIENTES POUR L'EXPRESSION DE L'IL-15, SON RÉCEPTEUR OU POUR DES MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS SA CASCADE DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE	19
TABLEAU II: PHÉNOTYPE DES SOURIS TRANSGÉNIQUES SUREXPRESSANT L'IL-21 OU DÉFICIENTES POUR L'EXPRESSION DE L'IL-21R α	37

Liste des abréviations

ADCC	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ADN	acide désoxyribonucléique
ARDS	syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (<i>acute respiratory distress syndrome</i>)
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATL	lymphome T de l'adulte (<i>adult T cell leukemia</i>)
CD	classes de différenciation (<i>clusters of differentiation</i>)
CD25	chaîne α du récepteur de l'IL-2 (IL-2R α)
CD36	récepteur de la thrombospondine
CD122	chaîne β du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 (IL-2/15R β)
CD124	chaîne α du récepteur de l'IL-4 (IL-4R α)
CD127	chaîne α du récepteur de l'IL-7 (IL-7R α)
CD129	chaîne α du récepteur de l'IL-9 (IL-9R α)
CD132	chaîne γ c
CD154	CD40 Ligand
CD213	chaîne α du récepteur de l'IL-13 (IL-13R α)
COX-2	cyclooxygénase-2
CpG	dinucléotides cytosine phospho guanine
CRE-BP	protéine liant l'élément de réponse de l'AMP cyclique (<i>cyclic AMP response element-binding protein</i>)
CSF	facteur de croissance hématopoïétique (<i>colony-stimulating factor</i>)
DC	cellules dendritiques (<i>dendritic cells</i>)
DETC	lymphocytes T épidermiques dendritiques (<i>dendritic epidermal T cells</i>)
DMSO	diméthyl sulfoxyde

ERK1/2	kinase de régulation des signaux extracellulaires 1/2 (<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>)
EST	étiquette de séquence exprimée (<i>expressed sequence tag</i>)
Ets	facteur de transcription contenant un domaine spécifique de transformation des érythroblastes (<i>erythroblast transformation specific</i>)
Flt3-L	ligand de la tyrosine kinase semblable au FMS-3 (<i>FMS-like tyrosine kinase 3-ligand</i>)
GAS	séquence activée par l'interféron-gamma (<i>gamma-interferon-activated sequence</i>)
G-CSF	facteur de croissance hématopoïétique des granulocytes (<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
γ c users	cytokines à chaîne gamma commune
GM-CSF	facteur de croissance hématopoïétique des granulocytes et des macrophages (<i>granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i>)
HTLV-1	virus de la leucémie des lymphocytes T humains-1 (<i>human T-cell leukemia virus-1</i>)
IAP	inhibiteur de l'apoptose (<i>inhibitor of apoptosis</i>)
ICAM	molécule d'adhésion intercellulaire (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
Ig	immunoglobuline
I-IEL	lymphocytes intraépithéliaux intestinaux (<i>intestinal intraepithelial lymphocytes</i>)
IFN- γ	interféron- γ
IL	interleukine
IL-1Ra	antagoniste du récepteur à l'IL-1 (<i>IL-1 receptor antagonist</i>)
iNOS	oxyde nitrique synthase inductible (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IRF-1	facteur de régulation de l'interféron-1 (<i>IFN regulatory factor-1</i>)
IRS-1	substrat du récepteur de l'insuline-1 (<i>insulin receptor substrate-1</i>)
ISRE	élément de réponse stimulé par les interférons (<i>interferon-stimulated response element</i>)
Jak	janus kinase

JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
kDa	kilodalton
KL	ligand de c-kit (<i>c-kit ligand</i>)
LIF	facteur inhibant les cellules leucémiques (<i>leukemia inhibitory factor</i>)
LSP	peptide signal long (<i>long signal peptide</i>)
Mφ	macrophage
MAPK	protéine kinase activée par des agents mitogènes (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MMP	métalloprotéase matricielle
MO	moelle osseuse
NF-AT	facteur nucléaire des cellules T activées (<i>nuclear factor of activated T cells</i>)
NF-IL-6	facteur nucléaire de l'IL-6 (<i>nuclear factor IL-6</i>)
NF-κB	facteur nucléaire kappaB (<i>nuclear factor kappaB</i>)
NK	tueuse naturelle (<i>natural killer</i>)
NO	oxyde nitrique (<i>nitric oxide</i>)
NOD	diabétique non obèse (<i>nonobese diabetic</i>)
NILR	nouveau récepteur d'interleukine (<i>novel interleukin receptor</i>)
OSM	oncostatine M
PAF	facteur d'activation plaquettaire (<i>platelet-activating factor</i>)
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	protéine kinase C
PMA	phorbol myristate acétate
PSGL-1	ligand glycoprotéique-1 de la sélectine-P (<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>)
RIP	protéines inactivant les ribosomes (<i>ribosome-inactivating proteins</i>)
Ser	sérine
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
sIL-1R II	récepteur soluble de type II de l'IL-1
Sp1	protéine de spécificité 1 (<i>specificity protein 1</i>)

SRE	élément de réponse des stéroïdes (<i>steroid response element</i>)
SSP	peptide signal court (<i>short signal peptide</i>)
STAT	transducteur du signal et activateur de la transcription (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
T-bet	facteur de transcription à boîte T exprimé dans les lymphocytes T (<i>T-box expressed in T cells</i>)
TCR	récepteur antigénique des cellules T
Th	lymphocyte T auxiliaire (<i>T helper</i>)
Tg	transgénique
TGF- β	facteur de croissance transformant- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TLR	récepteur semblable au récepteur Toll des drosophiles (<i>toll-like receptor</i>)
TNF- α	facteur onconécrosant- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
TNF-R1	récepteur-1 du TNF
TRAF2	facteur-2 associé au récepteur du TNF (<i>TNF receptor-associated factor 2</i>)
TRAIL	ligand associé au TNF induisant l'apoptose (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
Trp	tryptophane
TSLPR	récepteur lymphopoïétique du stroma thymique (<i>thymic stromal lymphopoietin receptor</i>)
VAA-I	<i>Viscum album</i> agglutinine-I
VEGF	facteur de croissance endothélial vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
X-SCID	immunodéficience sévère combinée liée au chromosome X (<i>X-linked severe combined immunodeficiency</i>)

Introduction

L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine pléiotropique jouant un rôle essentiel dans le développement des cellules NK, l'homéostasie des lymphocytes et le développement de l'immunité innée et acquise. L'expression inappropriée de l'IL-15 peut jouer un rôle dans le développement de certaines maladies inflammatoires et auto-immunes, telles l'arthrite rhumatoïde et la sarcoïdose. L'IL-15 active également les fonctions des neutrophiles, leucocytes exerçant un rôle primordial dans les processus inflammatoires et exprimant les trois chaînes du récepteur à l'IL-15, i.e. IL-15R α , IL-2/15R β (CD122) et γ c (CD132). De plus, l'IL-15 retarde l'apoptose des neutrophiles par un mécanisme encore non élucidé. Une meilleure compréhension de l'interaction entre les neutrophiles et l'IL-15 est donc essentielle pour le développement d'outils thérapeutiques appropriés pour le traitement de maladies inflammatoires et auto-immunes.

L'interleukine-21 (IL-21) est une cytokine récemment découverte dont la séquence primaire s'apparente à l'IL-15. Cette cytokine active les cellules B, T et NK suite à sa liaison à son récepteur composé d'une chaîne spécifique, l'IL-21R α , et de la chaîne commune CD132. Tout comme l'IL-15, l'IL-21 serait impliquée dans certaines maladies inflammatoires et auto-immunes. Aucune étude n'a toutefois démontré que l'IL-21 pourrait affecter les fonctions des neutrophiles et/ou avoir des effets pro-inflammatoires.

Le but de ce projet était d'évaluer les effets de l'IL-15 et de l'IL-21 sur les fonctions des neutrophiles. Nous avons tout d'abord vérifié si la *Viscum album* agglutinine-I peut moduler les réponses des neutrophiles induites par l'IL-15. Nous croyons que ce puissant inducteur d'apoptose peut inhiber l'activation des neutrophiles par l'IL-15 et ainsi être utilisé comme agent thérapeutique dans les maladies inflammatoires impliquant les neutrophiles. Nous avons par la suite évalué les mécanismes impliqués dans le retard d'apoptose des neutrophiles induit par l'IL-15. Étant donné que le GM-CSF retarde l'apoptose des neutrophiles en activant les voies de signalisation Jak-STAT et MAPK, en plus d'augmenter l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, nous croyons que

l'IL-15 retarde leur apoptose en activant certains membres de ces voies de signalisation importantes. Nous voulions également vérifier les effets de l'IL-15 sur l'adhésion des neutrophiles et leur recrutement *in vivo* dans le modèle inflammatoire murin de la poche d'air. Nous croyons que l'IL-15 peut influencer le sort des neutrophiles au site inflammatoire en augmentant leur recrutement et leur adhésion aux cellules environnantes. Nous avons finalement vérifié si l'IL-21 est un agoniste des neutrophiles. Étant donné que les neutrophiles expriment CD132, chaîne essentielle de l'IL-21R, et que les fonctions des neutrophiles sont modulées par l'IL-15, une cytokine qui possède un certain degré d'homologie avec l'IL-21, nous avons envisagé que l'IL-21 pourrait également activer leurs fonctions et augmenter leur recrutement au foyer inflammatoire.

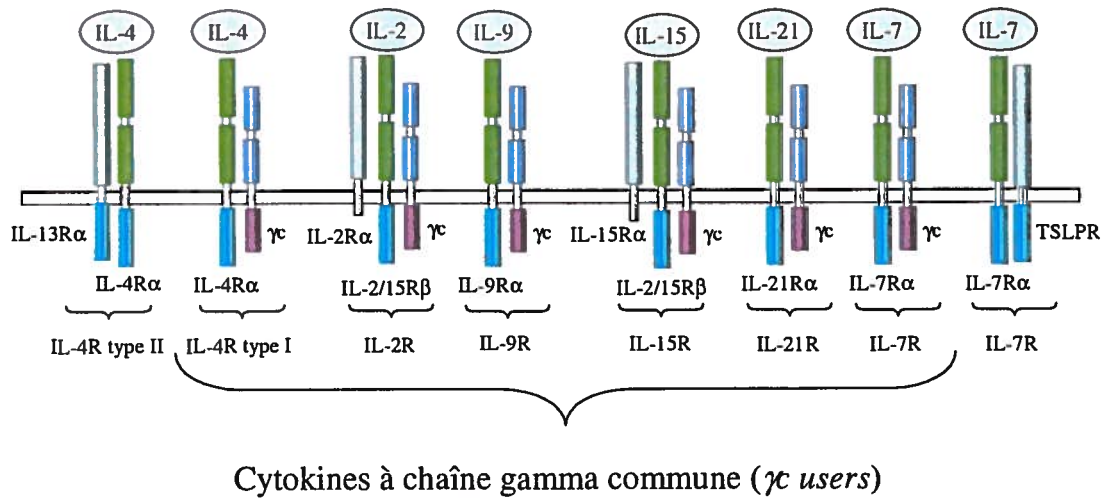
Ce document est divisé en plusieurs chapitres. Le premier chapitre est une revue des connaissances actuelles sur les cytokines à chaîne gamma commune, plus particulièrement l'IL-15 et l'IL-21, ainsi que sur les neutrophiles. En premier lieu, les caractéristiques générales des cytokines à chaîne gamma commune seront abordées. En second lieu, les caractéristiques spécifiques de l'IL-15, de l'IL-21 et de leurs récepteurs, ainsi que leurs effets biologiques seront discutés. Ensuite, les fonctions des neutrophiles et leur modulation par les cytokines seront détaillées. Le second chapitre présentera les objectifs spécifiques du projet de recherche. Les résultats obtenus lors de mon doctorat seront présentés dans les chapitres subséquents sous la forme de cinq articles, dont je suis l'auteur principal. Ces articles se rapportent aux différents volets du projet. Quatre de ces articles sont déjà parus dans des revues avec comité de lecture et sont présentés dans cette thèse sous leur version originale anglaise. Le cinquième article est encore sous forme de manuscrit et a récemment été soumis au journal avec comité de lecture « The Journal of Immunology ». Chacun des articles est précédé d'une mise en contexte, d'une traduction française du résumé original et du détail de la contribution de chacun des auteurs de l'article. Par la suite, l'ensemble de cet ouvrage sera synthétisé et analysé dans le dernier chapitre. Finalement, quelques résultats supplémentaires n'ayant pas été intégrés aux articles seront présentés en annexe.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1. Les cytokines à chaîne gamma commune

Les cytokines à chaîne gamma commune (cytokines à chaîne γ ou *γ users*) sont des interleukines qui partagent une chaîne de leur récepteur. Cette famille de cytokines, qui inclut l'interleukine-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21, est également connue sous l'appellation de famille de l'IL-2. Les cytokines à chaîne γ font partie de la famille des hématopoïétines, dont les membres possèdent tous une structure à 4 hélices alpha. La famille des hématopoïétines inclut l'érythropoïétine, l'IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, l'OSM (oncostatine M), le LIF (*leukemia inhibitory factor*), le G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) et le GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) (Bazan, 1990).

Les cytokines à chaîne γ sont connues pour médier leurs effets biologiques suite à leur liaison à un récepteur composé d'au moins deux chaînes : la chaîne γ (CD132) et une chaîne spécifique à chacune des cytokines. La chaîne α du récepteur de l'IL-4 (IL-4R α - CD124), l'IL-7R α (CD127), l'IL-9R α (CD129), l'IL-21R α et CD132 font partie de la superfamille des récepteurs de cytokines de classe I. Cette superfamille de récepteurs, qui inclut également les récepteurs de l'hormone de croissance, de l'IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12 et IL-13, de l'érythropoïétine et de la thrombopoïétine, possèdent tous quatre résidus cystéine et un motif « WSXWS » (Trp-Ser-acide aminé non conservé-Trp-Ser) dans la portion extracellulaire (Touw *et al.*, 2000). L'IL-2R α (CD25) et l'IL-15R α , par contre, sont des protéines membranaires de type I qui ne font pas partie de cette superfamille de récepteurs de cytokines. Elles sont plutôt considérées comme les représentants d'une nouvelle famille de récepteurs de cytokines (Giri *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2001). L'IL-2 et l'IL-15 partagent également une autre chaîne de leur récepteur, l'IL-2/15R β (CD122) qui fait aussi partie de la superfamille de cytokines de classe I (Touw *et al.*, 2000). Il existe deux types d'IL-4R : le récepteur de type I composé de CD124 et CD132 et le récepteur de type II composé de CD124 et IL-13R α (CD213). Il existe aussi deux types d'IL-7R : l'un composé de CD127 et CD132 et l'autre composé de CD127 et du TSLPR (*thymic stromal lymphopoietin receptor*) (Ozaki et Leonard, 2002). La **figure 1** illustre les récepteurs des différentes cytokines à chaîne γ .



(inspiré de Ozaki et Leonard, 2002)

Figure 1 : Représentation schématisée des récepteurs de cytokines à chaîne γ . Les cytokines à chaîne γ sont connues pour médier leurs effets biologiques suite à leur liaison à un récepteur composé d'au moins deux chaînes : la chaîne γ (CD132) et une chaîne spécifique α à chacune des cytokines. L'IL-2 et l'IL-15 partagent également une autre chaîne de leur récepteur, l'IL-2/15R β . Deux types d'IL-4R sont connus : l'IL-4R de type I composé de l'IL-4R α et de γ et l'IL-4R de type II composé de l'IL-4R α et IL-13R α . Il existe aussi deux types d'IL-7R : l'un composé de IL-7R α et γ et l'autre composé de IL-7R α et de TSLPR.

1.1 Pléiotropie et redondance

La pléiotropie se définit comme la capacité d'une cytokine d'exercer de multiples actions alors que la redondance se définit comme la capacité de plusieurs cytokines d'exercer des effets similaires. Les effets pléiotropiques de différentes cytokines peuvent s'expliquer par la présence d'un récepteur particulier sur une multitude de lignées cellulaires différentes ou par la capacité d'une cytokine d'activer plusieurs voies de signalisation différentes affectant des fonctions différentes. Les cytokines à chaîne γ ont des effets pléiotropiques puisque chacune des cytokines de cette famille peut activer différents types cellulaires (Ozaki et Leonard, 2002). Par exemple, l'IL-15 exerce ses effets sur les neutrophiles, les lymphocytes T, les cellules NK (*natural killer*), les lymphocytes B et les cellules musculaires (Fehniger et Caligiuri, 2001). La redondance aux niveaux des actions de différentes cytokines peut s'expliquer par la distribution cellulaire similaire de

récepteurs spécifiques pour des cytokines différentes ou par l'utilisation d'une chaîne de récepteur commune et l'activation de voies de signalisation similaires (Ozaki et Leonard, 2002). Des effets redondants caractérisent les cytokines à chaîne γ puisque ces cytokines partagent une chaîne de leur récepteur. Les effets sont encore plus marquants pour l'IL-2 et l'IL-15 puisque ces deux cytokines partagent une autre chaîne de leur récepteur, la chaîne CD122, en plus d'activer la même voie de signalisation (Leonard et Lin, 2000).

1.2 La voie de signalisation Jak-STAT

Il a été montré que les récepteurs de cytokines de classe I s'associent à la famille des tyrosines kinases Jak (*janus kinase*). Cette famille de kinases est composée de quatre membres, soit Jak-1, Jak-2, Jak-3 et Tyk-2. De manière générale, les récepteurs spécifiques de la famille de l'IL-2, i.e. CD122, CD124, CD127, CD129 et l'IL-21R α , s'associent à Jak-1 alors que la chaîne CD132 s'associe à Jak-3. La phosphorylation des Jak induit la phosphorylation des STAT (*signal transducer and activator of transcription*), une famille de facteurs de transcription composée de sept membres, i.e. STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. La phosphorylation des STAT par les Jak permet leur homo ou hétérodimérisation. Ces dimères vont ensuite transloquer au noyau et réguler la transcription de multiples gènes. Il a été montré que les cytokines à chaîne γ activent des membres identiques des STAT. Par exemple, STAT5a et STAT5b sont activés par la plupart des membres de la famille de l'IL-2, ainsi que par le GM-CSF, la prolactine et l'hormone de croissance. STAT1 et STAT3 sont également activés par les cytokines à chaîne γ (Ozaki et Leonard, 2002; Kovanen et Leonard, 2004).

1.3 L'importance de la chaîne CD132 : l'exemple du cas des enfants-bulles

La chaîne CD132 est d'une importance capitale pour le développement du système immunitaire. Le cas des patients atteints d'une mutation au niveau du gène codant pour CD132 le démontre clairement. Le gène de la chaîne CD132 est localisé sur le chromosome X chez l'humain et la souris et une mutation à son niveau entraîne une

forme d'immunodéficience sévère combinée appelée X-SCID (*X-linked severe combined immunodeficiency*), également connue sous le nom de la maladie des « enfants-bulles » (Noguchi *et al.*, 1993a; Noguchi *et al.*, 1993b; Cao *et al.*, 1993). Comme la chaîne CD132 est exprimée par la plupart des cellules hématopoïétiques, les patients atteints de X-SCID ont des défauts au niveau du développement des fonctions des lymphocytes B, T et des cellules NK, de par le fait que ces cellules ne peuvent pas répondre aux cytokines utilisant la chaîne CD132 (Nakarai *et al.*, 1994; Schumann *et al.*, 1996; Kovanen et Leonard, 2004). L'absence de cellules T et NK est due, entre autre, à la signalisation intracellulaire déficiente de l'IL-7 et de l'IL-15 alors que l'absence de signalisation par l'IL-4 et l'IL-21 contribue à la déféctuosité des cellules B. Les enfants atteints de X-SCID doivent donc absolument vivre dans un environnement stérile pour survivre. Une greffe de moelle osseuse permet de sauver la plupart des enfants atteints de X-SCID (Kovanen et Leonard, 2004).

2. L'interleukine-15

2.1 Découverte de la cytokine

La capacité à stimuler la prolifération dépendante de IL-2 de la lignée cellulaire CTLL-2 en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-2 fut à l'origine de la découverte de l'IL-15 par deux groupes. D'une part, Grabstein et ses collaborateurs (1994) ont découvert une molécule qu'ils ont nommé IL-15 en analysant le surnageant de la lignée cellulaire épithéliale simienne CV-1/EBNA (Grabstein *et al.*, 1994). D'autre part, Burton et ses collaborateurs (1994) ont remarqué que le surnageant de la lignée cellulaire HuT-102, une lignée ATL (*adult T cell leukemia*) associée au HTLV-I (*human T-cell leukemia virus-1*), pouvait stimuler la prolifération des lymphocytes T. Une molécule de ce surnageant a été purifiée et nommée IL-T (Bamford *et al.*, 1994; Burton *et al.*, 1994). L'utilisation d'anticorps appropriés a par la suite permis de démontrer que l'IL-15 et l'IL-T constituaient une seule et même molécule (Bamford *et al.*, 1996).

2.2 Caractéristiques de l'IL-15

2.2.1 Gène

Le gène de 9 exons codant pour l'IL-15 est situé sur le chromosome humain 4q31 et sur la région centrale du chromosome murin 8 (Anderson *et al.*, 1995a; Krause *et al.*, 1996). L'analyse du promoteur du gène de l'IL-15 a révélé l'existence de plusieurs sites de liaison potentiels pour différents facteurs de transcription dont NF- κ B (*nuclear factor kappaB*), NF-IL6 (*nuclear factor IL-6*), GAS (*gamma-interferon-activated sequence*) et ISRE (*interferon-stimulated response element*). Le site de liaison à NF- κ B semble essentiel pour l'activation transcriptionnelle du gène (Azimi *et al.*, 1998; Washizu *et al.*, 1998).

2.2.2 Structure

Malgré ses effets identiques à ceux de l'IL-2 sur la prolifération des cellules CTLL-2, la séquence primaire de l'IL-15 possède peu d'homologie avec celle de l'IL-2 (Grabstein *et al.*, 1994). L'ARNm de l'IL-15 code pour deux précurseurs polypeptidiques différents : l'un contenant une séquence signal anormalement longue de 48 acides aminés et l'autre, plus courte, de 21 acides aminés. Ces deux précurseurs génèrent une forme mature identique de l'IL-15 qui consiste en une glycoprotéine de 114 acides aminés avec une masse moléculaire de 14-15 kDa (Grabstein *et al.*, 1994; Krause *et al.*, 1996; Tagaya *et al.*, 1997; Onu *et al.*, 1997; Prinz *et al.*, 1998).

2.2.3 Distribution

L'ARNm de l'IL-15 se retrouve dans une multitude de tissus (placenta, muscle squelettique, rein, poumon, cœur) et une variété de cellules sous différentes conditions de stimulation (monocytes/macrophages, cellules dendritiques, kératinocytes, astrocytes, cellules épithéliales de l'intestin) (Grabstein *et al.*, 1994; Carson *et al.*, 1995; Doherty *et al.*, 1996; Blauvelt *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Reinecker *et al.*, 1996; Jonuleit *et al.*, 1997). La protéine, par contre, est produite par un nombre restreint de cellules. Il a été montré que l'IL-15 est synthétisée par les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules épithéliales thymiques et l'épithélium intestinal foetal, suggérant un rôle important de cette cytokine dans l'hématopoïèse (Grabstein *et al.*, 1994; Mrozek *et al.*, 1996; Leclercq *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1998; Giron-Michel *et al.*, 2003). Au niveau d'une réponse immune, ce sont surtout les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques qui sécrètent des quantités significatives d'IL-15 (Carson *et al.*, 1995; Doherty *et al.*, 1996; Blauvelt *et al.*, 1996; Jonuleit *et al.*, 1997).

2.2.4 Mécanismes de régulation

Malgré l'expression par une multitude de tissus et de cellules de l'ARNm de l'IL-15, il est plus difficile de détecter la forme protéique de la cytokine. En effet, l'IL-15 a un potentiel de sécrétion très faible comparativement à d'autres cytokines comme l'IL-2 et l'IL-4 (Tagaya *et al.*, 1997). Différents mécanismes complexes de régulation de l'IL-15 ont été identifiés et permettent de fournir une explication à la faible sécrétion de cette cytokine. Tout d'abord, il y a la présence du peptide signal anormalement long (*long signal peptide – LSP*) et de celui plus court (*short signal peptide – SSP*). Il a été démontré que l'IL-15-SSP est traduit plus efficacement que l'IL-15-LSP, mais que sa localisation est restreinte au cytoplasme et au noyau. L'IL-15-LSP, au contraire, est difficilement traduit, mais est dirigé vers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi en vue d'une sécrétion éventuelle (Tagaya *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1998; Gaggero *et al.*, 1999; Pereno *et al.*, 1999; Kurys *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2005). Le rôle du peptide signal dans la sécrétion de l'IL-15 a également été confirmé *in vivo* à l'aide de souris transgéniques surexprimant IL-15-LSP ou IL-15-SSP (Nishimura *et al.*, 2000). Le second mécanisme de régulation est la présence de multiples codons de départ AUG dans l'ARNm codant pour la forme IL-15-LSP. Il a été montré que ces multiples codons de départ (12 chez l'humain) réduisent considérablement l'efficacité de la traduction en protéine mature. L'élimination de la majorité des codons AUG a d'ailleurs permis d'augmenter de 5 à 10 fois la production d'IL-15 (Bamford *et al.*, 1996). Finalement, la présence d'un régulateur négatif dans la portion C-terminale des précurseurs de l'IL-15 semble réduire la quantité extracellulaire de la cytokine (Gaggero *et al.*, 1999). L'élimination de ces trois éléments de régulation a permis d'augmenter de 250 fois la synthèse d'IL-15 (Bamford *et al.*, 1998). La génération de souris transgéniques surexprimant l'IL-15 suite à l'élimination des systèmes de contrôles post-transcriptionnels a permis de montrer l'importance *in vivo* de la régulation de l'IL-15, puisque ces souris développent une leucémie fatale suite à l'expansion excessive des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ (Fehniger *et al.*, 2001).

2.2.5 Expression membranaire

Tout récemment, l'IL-15 a été détectée à la surface des monocytes, des cellules dendritiques (DC – *dendritic cells*), des fibroblastes et des kératinocytes. Il a été montré que cette forme d'IL-15, non liée à son récepteur, entraîne la prolifération, la différenciation et/ou l'activation des lymphocytes T, des cellules NK et des progéniteurs hématopoïétiques et ce, de manière aussi efficace, sinon plus, que la forme soluble (Musso *et al.*, 1999; Ruckert *et al.*, 2000; Neely *et al.*, 2001; Rappl *et al.*, 2001; Briard *et al.*, 2002; Ferlazzo *et al.*, 2004; Giron-Michel *et al.*, 2005). La stimulation des monocytes avec du LPS ou du GM-CSF augmente l'expression d'IL-15 à leur surface suite à la mobilisation d'une réserve intracellulaire d'IL-15 vers la membrane cytoplasmique (Musso *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 2001). Ainsi, l'expression membranaire de l'IL-15 permet à la cytokine d'agir sur une multitude de cellules malgré qu'elle soit si peu abondante dans le milieu extracellulaire.

2.2.5.1 Signalisation inverse

De nouveaux résultats suggèrent que l'IL-15 membranaire des monocytes pourrait induire une signalisation inverse (*reverse signaling*), c'est-à-dire que l'IL-15 synthétisée et exprimée à la membrane cellulaire des monocytes pourrait, suite à sa liaison par un récepteur soluble ou un anticorps, induire une signalisation intracellulaire dans ces mêmes monocytes (Budagian *et al.*, 2004; Neely *et al.*, 2004). L'IL-15 membranaire agirait donc, en quelque sorte, comme un récepteur (**figure 2**). Il a été montré que la stimulation des monocytes avec de l'IL-15R α soluble ou un anticorps anti-IL-15 entraîne l'activation de membres de la famille des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), c'est-à-dire ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) et p38, ainsi qu'une GTPase de la famille Rho, Rac3. Il en résulte une augmentation de la migration, de l'adhésion cellulaire et de la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (CXCL8/IL-8, IL-6 et TNF- α - *tumor necrosis factor- α*) (Budagian *et al.*, 2004; Neely *et al.*, 2004).

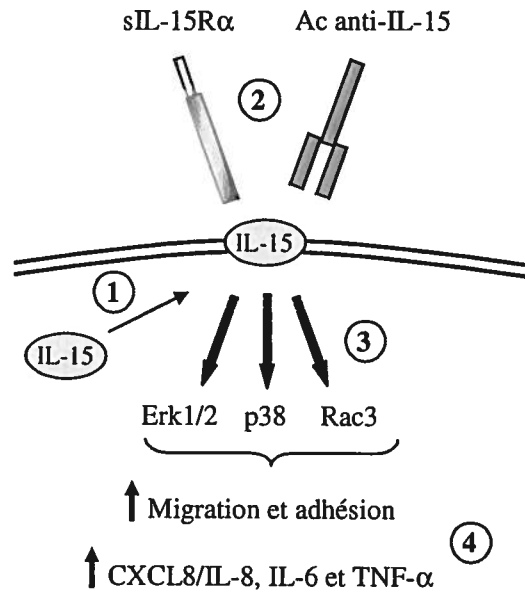


Figure 2 : Phénomène de signalisation inverse induite par l'IL-15 dans les monocytes. L'IL-15 est synthétisée et exprimée à la membrane cellulaire des monocytes (1). La liaison de l'IL-15 avec l'IL-15R α soluble ou un anticorps anti-IL-15 (2) entraîne l'activation de ERK1/2, p38MAPK et Rac3 (3). Il en résulte une augmentation de la migration, de l'adhésion cellulaire et de la production de CXCL8/IL-8, IL-6 et TNF- α (4).

2.3 Découverte du récepteur

L'utilisation d'anticorps anti-IL-2R β a démontré que la chaîne β de l'IL-2R était essentielle aux effets de l'IL-15 (Sharon *et al.*, 1986; Bamford *et al.*, 1994; Grabstein *et al.*, 1994). Suite à cette découverte, il a été montré que les chaînes β et γ du récepteur de l'IL-2 étaient requises tant pour la liaison de l'IL-15 que pour sa capacité à induire un signal (Takeshita *et al.*, 1992; Giri *et al.*, 1994). Finalement, une nouvelle protéine liant spécifiquement l'IL-15 a été caractérisée, clonée puis nommée IL-15R α (Giri *et al.*, 1995). Par ailleurs, un récepteur distinct, l'IL-15RX, uniquement exprimé par les mastocytes, a également été identifié (Tagaya *et al.*, 1996). Une étude récente a toutefois montré que l'IL-15RX représentait plutôt des isoformes distincts de l'IL-15R α exprimés uniquement par les mastocytes (Bulanova *et al.*, 2003).

2.4 Caractéristiques de l'IL-15R

2.4.1 Gène

L'analyse des gènes de l'IL-15R α et de l'IL-2R α (CD25) révèle que ceux-ci partagent le même locus sur le chromosome 10p15-14 chez l'humain et le même locus sur le chromosome 2 chez la souris (Anderson *et al.*, 1995b). De plus, ces deux récepteurs possèdent une structure similaire d'introns et d'exons (Giri *et al.*, 1995). Huit transcrits différents de l'IL-15R α ont été identifiés. Ces huit isoformes résultent de l'épissage des 7 exons du gène de l'IL-15R α , incluant toutes les combinaisons provenant de la délétion des exons 2 et 3 et de l'utilisation d'un exon 7 alternatif (Dubois *et al.*, 1999). Le gène codant pour la chaîne CD122 est situé sur le chromosome 22q11-13 chez l'humain et le chromosome 15 chez la souris. Le gène entier de CD122 est composé de 10 exons, mais seuls les exons 2 à 10 codent pour la protéine (Gnarra *et al.*, 1990; Shibuya *et al.*, 1990; Campbell *et al.*, 1992).

2.4.2 Structure

Tout comme la chaîne CD25, l'IL-15R α possède un motif de liaison protéique appelé domaine Sushi (ou motif GP-1), essentiel à la liaison de la cytokine. Cette caractéristique, en plus de leur structure similaire d'introns et d'exons, a permis de définir l'IL-15R α et CD25 comme les représentants d'une nouvelle famille de récepteurs de cytokines (Giri *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2001). L'IL-15R α possède également de multiples sites de glycosylation potentiels et une portion cytoplasmique très courte (Anderson *et al.*, 1995b; Dubois *et al.*, 1999). Tel que décrit précédemment, huit transcrits différents de l'IL-15R α ont été identifiés. De ces huit transcrits, on distingue ceux possédant l'exon 2 et ceux ne le possédant pas (Δ 2-IL-15R α). Les isoformes Δ 2-IL-15R α sont incapables de lier l'IL-15 et sont localisés à la membrane nucléaire. Les autres isoformes fixent l'IL-15 et se retrouvent à la membrane cytoplasmique, au réticulum endoplasmique et au niveau de l'appareil de Golgi. L'exon 2 du gène de l'IL-15R α est donc essentiel à la localisation

post-transcriptionnelle et à la liaison de la cytokine à son récepteur (Anderson *et al.*, 1995a; Anderson *et al.*, 1995b; Dubois *et al.*, 1999; Pereno *et al.*, 1999).

2.4.3 Distribution

La distribution cellulaire et tissulaire de l'IL-15R α est très diversifiée, comparativement à celle de CD25 (Anderson *et al.*, 1995b; Giri *et al.*, 1995). Les huit transcrits différents de l'IL-15R α ont été détectés dans plusieurs tissus (cerveau, intestin, foie) et cellules (cellules mononucléées du sang périphérique, kératinocytes, cellules T CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$ et une multitude de lignées cellulaires) (Dubois *et al.*, 1999). L'expression de l'IL-15R α peut être augmentée dans différents types cellulaires, dont les lymphocytes T et les macrophages, suite à une stimulation par des cytokines (IL-2, interféron- γ – IFN- γ), des agents mitogènes (PMA – phorbol myristate acétate), des anticorps (anticorps anti-CD3) et certains virus (HTLV-I) (Giri *et al.*, 1995; Mariner *et al.*, 2001). Une forme soluble de l'IL-15R α , produite par protéolyse, a récemment été identifiée et agirait comme un antagoniste naturel de l'IL-15 (Mortier *et al.*, 2004). La distribution de la chaîne CD122 est relativement répandue au sein des cellules du système immunitaire. En effet, elle est constitutivement exprimée par les cellules CD34 $^{+}$ (progéniteurs hématopoïétiques), les cellules NK, les lymphocytes T CD8 $^{+}$, les monocytes, les neutrophiles et elle est inductible dans les cellules T CD4 $^{+}$ (Rosolen *et al.*, 1989; Hattori *et al.*, 1990; Schumann *et al.*, 1996).

2.4.4 Affinité de l'IL-15 pour son récepteur

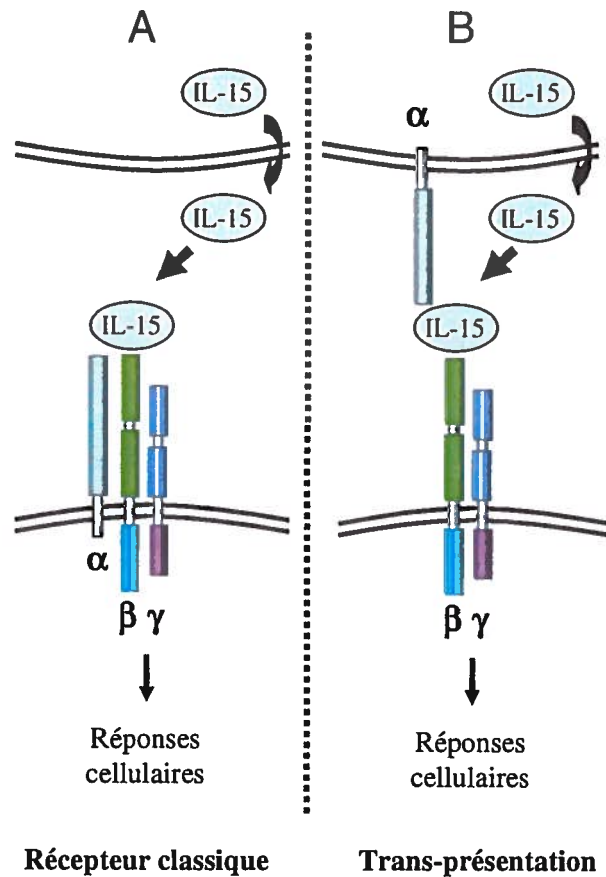
L'IL-15 se lie avec une affinité élevée à l'IL-15R α ou au récepteur hétérotrimérique, contrairement à la chaîne CD25 qui ne lie l'IL-2 qu'avec une très faible affinité en absence des chaînes CD122 et CD132. Toutefois, seules les chaînes β et γ sont responsables de l'induction du signal. Tout comme l'IL-2, l'IL-15 peut se lier au dimère $\beta\gamma$ avec une affinité intermédiaire, et entraîner la signalisation intracellulaire en absence de la chaîne spécifique α (Giri *et al.*, 1994; Balasubramanian *et al.*, 1995). Le complexe ligand-récepteur IL-15/ $\beta\gamma$ est toutefois moins stable que le complexe IL-2/ $\beta\gamma$ (de Jong *et*

al., 1996). Malgré le fait que l'IL-15 et l'IL-2 soient en compétition pour la liaison au complexe des chaînes CD122 et CD132, les deux cytokines se fixent sur des épitopes différents sur chacune des chaînes (de Jong *et al.*, 1998; Lehours *et al.*, 2000).

2.4.5 La trans-présentation : propriété de l'IL-15R α

Dubois et ses collaborateurs (2002) proposent une théorie selon laquelle l'IL-15R α peut fixer l'IL-15 et la présenter à des cellules voisines en « trans » ne possédant que le complexe $\beta\gamma$ afin d'induire une signalisation intracellulaire dans ces cellules (**figure 3**). La trans-présentation de l'IL-15 a des répercussions biologiques importantes puisque le complexe IL-15/IL-15R α stimule aussi efficacement la prolifération des cellules IL-15R $\beta\gamma^+$ que l'IL-15 soluble celle des cellules IL-15R $\alpha\beta\gamma^+$ (Dubois *et al.*, 2002). La trans-présentation de l'IL-15 par l'IL-15R α serait essentielle à l'homéostasie et aux fonctions des cellules NK et des lymphocytes T CD8 $^+$ mémoires et permettrait d'expliquer comment une cytokine si peu abondante peut maintenir l'homéostasie des cellules T mémoires qui migrent constamment vers les tissus périphériques (Sallusto et Lanzavecchia, 2000; Burkett *et al.*, 2003; Koka *et al.*, 2004; Burkett *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005). La théorie de la trans-présentation permet également d'expliquer que des cellules NK et T CD8 $^+$ transférées dans des souris IL-15R $\alpha^{-/-}$ sont incapables de proliférer alors que des cellules NK et T CD8 $^+$ de souris IL-15R $\alpha^{-/-}$ prolifèrent normalement chez des souris de type sauvages (Lodolce *et al.*, 2001; Koka *et al.*, 2003). Ce phénomène de trans-présentation semble exclusivement réservé à l'IL-15R α et à CD25 (Eicher et Waldmann, 1998; Schluns *et al.*, 2004; Sandau *et al.*, 2004; Schluns *et al.*, 2005). L'équipe de Dubois (2002) a également suggéré que la formation du complexe IL-15/IL-15R α à la surface des cellules induit l'internalisation du complexe vers le compartiment endosomal et son éventuel « recyclage » vers la surface des cellules au lieu d'être acheminé vers les lysosomes pour dégradation. Ceci conduit à la persistance de l'IL-15 à la membrane plasmique et, par le fait même, de ses effets et ce, même après l'élimination de l'IL-15 du milieu de culture (Dubois *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent qu'en conditions physiologiques l'IL-15 serait majoritairement exprimée sous sa forme

membranaire plutôt que sous sa forme sécrétée et exercerait un rôle physiologique beaucoup plus important que ne le laissaient supposer les publications antérieures.



(inspiré de Schluns, 2005)

Figure 3 : Schématisation de la trans-présentation de l'IL-15 par l'IL-15R α . Selon le modèle classique, l'IL-15 peut induire une signalisation cellulaire seulement si la cellule possède les trois chaînes du récepteur à l'IL-15 (A). La théorie de la trans-présentation propose que l'IL-15R α peut fixer l'IL-15 et la présenter à des cellules voisines en « trans » qui ne possèdent que le complexe $\beta\gamma$ afin d'induire une signalisation intracellulaire (B).

2.5 Effets biologiques de l'IL-15

2.5.1 Développement du système immunitaire

2.5.1.1 Études *in vivo*

Les souris déficientes pour l'expression de l'IL-15, le facteur de transcription IRF-1 (*IFN regulatory factor-1*), les différentes chaînes de son récepteur ou des molécules impliquées dans sa signalisation intracellulaire ont des défauts au niveau du développement et de l'activation des cellules d'origine lymphoïde. À l'inverse, une augmentation du nombre de ces cellules a été observée chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-15 (**tableau I**). Des chercheurs ont également rapporté le cas d'un jeune garçon présentant un phénotype d'immunodéficience sévère combinée avec un nombre réduit de lymphocytes et une absence de cellules NK. Une analyse moléculaire a permis de montrer une expression réduite de CD122 et une phosphorylation minimale de Jak-3 suite à une stimulation des cellules de ce jeune patient (Gilmour *et al.*, 2001). Ces phénotypes indiquent que l'IL-15 joue un rôle essentiel dans le développement des cellules lymphoïdes.

2.5.1.2 Études *in vitro*

Il a été montré que l'IL-15 induit la différenciation de cellules progénitrices CD34⁺ en cellules NK CD56⁺ fonctionnelles et en cellules dendritiques (Mrozek *et al.*, 1996; Puzanov *et al.*, 1996; Bykovskaia *et al.*, 1999; Vosshenrich *et al.*, 2005). L'IL-15 joue également un rôle dans la prolifération et l'homéostasie des cellules NK (Carson *et al.*, 1994; Ranson *et al.*, 2003b; Prlic *et al.*, 2003). De plus, l'IL-15 a été identifié comme un facteur de prolifération des cellules T mémoires CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que des cellules T naïves CD8⁺ (Grabstein *et al.*, 1994; Burton *et al.*, 1994; Kanegane et Tosato, 1996; Thulesen *et al.*, 2000; Schluns *et al.*, 2002; Judge *et al.*, 2002). Il a été suggéré que l'IL-15 serait requis pour la maturation et la prolifération homéostatique des cellules T,

TABEAU I : PHÉNOTYPE DES SOURIS TRANSGÉNIQUES SUREXPRESSANT L'IL-15 OU DÉFICIENTES POUR L'EXPRESSION DE L'IL-15, SON RÉCEPTEUR OU POUR DES MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS SA CASCADE DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE

Mutation	Phénotype	Références
IL-15 ^{-/-}	Absence de cellules NK Réduction des cellules NK-T, CD8 ⁺ et I-IEL Incapable de développer une réponse immunitaire adéquate à une infection virale	Kennedy <i>et al.</i> , 2000
IRF-1 ^{-/-} (expression d'IL-15 déficiente)	Réduction des cellules NK et de leur activité Réduction des cellules NK-T, CD8 ⁺ et I-IEL	Ogasawara <i>et al.</i> , 1998; Ohteki <i>et al.</i> , 1998
IL-15Rα ^{-/-}	Absence de cellules NK Réduction des cellules NK-T, CD8 ⁺ et I-IEL Défaut d'activation des lymphocytes T	Lodolce <i>et al.</i> , 1998
CD122 ^{-/-}	Absence de cellules NK et DETC Réduction des cellules NK-T, CD8 ⁺ et I-IEL	Suzuki <i>et al.</i> , 1997; Ohteki <i>et al.</i> , 1997; Minagawa <i>et al.</i> , 2002
CD132 ^{-/-}	Réduction des cellules NK, B et T	DiSanto <i>et al.</i> , 1995; Cao <i>et al.</i> , 1995
Jak3 ^{-/-} (signalisation par CD132 déficiente)	Réduction des cellules NK et I-IEL Absence de cellules DETC	Park <i>et al.</i> , 1995; Grossman <i>et al.</i> , 1999
STAT5b ^{-/-} (signalisation par CD132 déficiente)	Réduction des cellules NK Défaut d'activation des cellules NK	Imada <i>et al.</i> , 1998
Tg IL-15 murine	Leucémie fatale suite à l'expansion excessive des cellules NK et CD8 ⁺	Fehniger <i>et al.</i> , 2001
Tg IL-15 humaine	Augmentation du nombre de cellules NK, CD8 ⁺ mémoires, NK-T et Tγδ	Marks-Konczalik <i>et al.</i> , 2000

Abréviations : Tg, transgénique ; NK-T, lymphocytes qui expriment le récepteur antigénique des cellules T (TCR) et des molécules de surface de cellules NK; I-IEL, lymphocytes intraépithéliaux intestinaux (*intestinal intraepithelial lymphocytes*); DETC, lymphocytes T épidermiques dendritiques (*dendritic epidermal T cells*); Tγδ, lymphocytes T exprimant le TCR d'isoforme γδ

mais ne serait pas un facteur essentiel pour leur génération (Zhang *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002; Goldrath *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003; Burkett *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2004). L'IL-15 ne semble pas du tout impliqué dans le développement des lymphocytes B (Muench *et al.*, 2000). Des études ont également montré que l'IL-15 joue un rôle crucial dans la prolifération, l'activation et l'homéostasie de populations de cellules T de l'immunité innée, i.e. les cellules NK-T, les I-IEL et les DETC (Edelbaum *et al.*, 1995; Inagaki-Ohara *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2002; De Creus *et al.*, 2002; Cookson et Reen, 2003; Ranson *et al.*, 2003a; Ebert, 2005). Les cellules NK-T sont des lymphocytes exprimant un TCR $\alpha\beta$ de diversité limitée et des molécules de surface de cellules NK généralement restreintes à la molécule de surface CD1d et qui reconnaissent des antigènes glycolipidiques (Elewaut et Kronenberg, 2000). Les I-IEL sont des lymphocytes T au développement extra-thymique localisés sur les surfaces basolatérales des cellules épithéliales de l'intestin qui jouent un rôle-clé dans l'immunité mucoale (Porter et Malek, 2000). Les DETC, quant à elles, sont des cellules T d'isoforme TCR $\gamma\delta$ de la peau jouant un rôle dans l'initiation et l'inhibition de l'inflammation induite par une blessure (Jameson *et al.*, 2004).

2.5.2 Cellules du système immunitaire

L'IL-15 est une cytokine importante dans le développement d'une réponse immunitaire puisqu'elle module autant les fonctions des cellules du compartiment lymphoïde que myéloïde. La **figure 4** résume les effets de l'IL-15 sur les différentes cellules du système immunitaire. Il est à noter que l'IL-15 module également les fonctions des neutrophiles, mais cet aspect sera élaboré à la section 4.7.5.

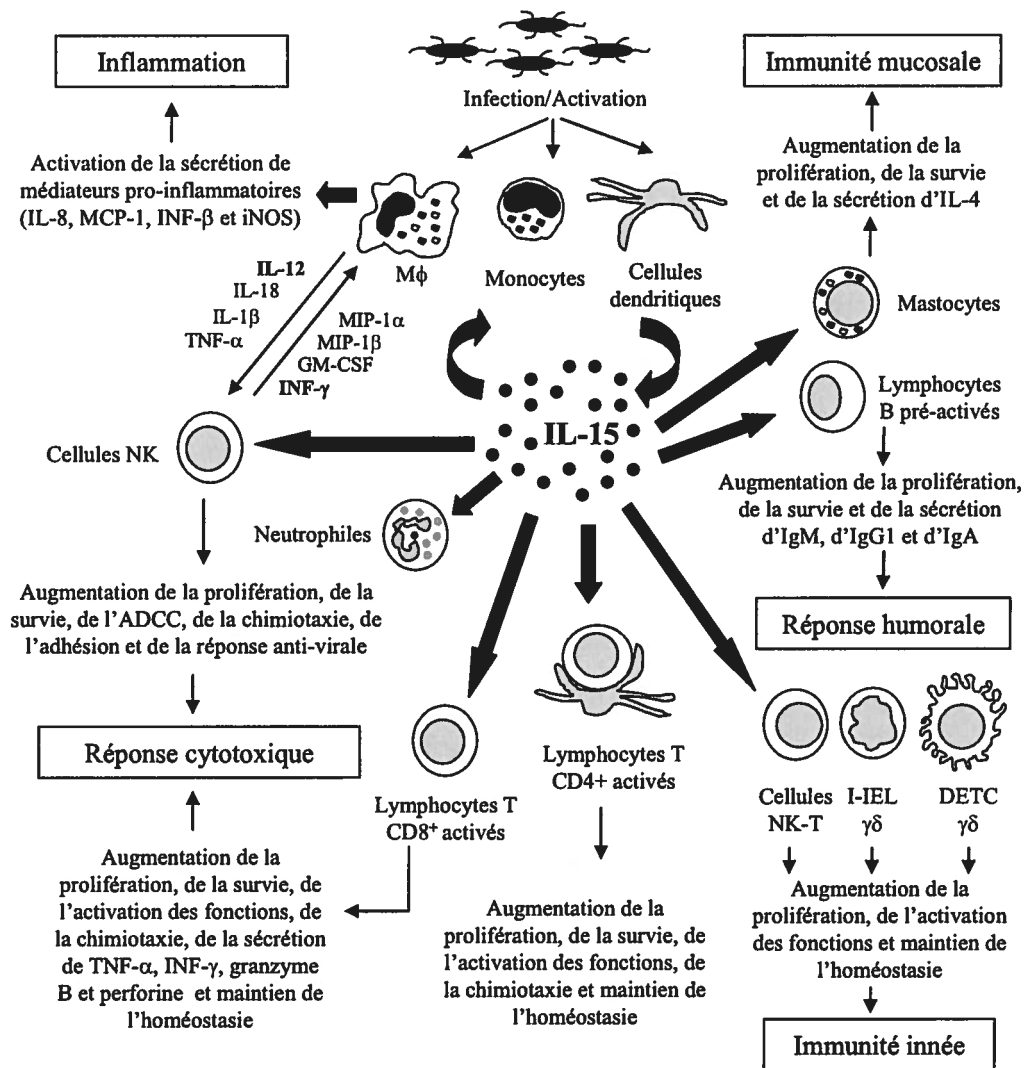


Figure 4 : Effets biologiques de l'IL-15 : rôle dans l'immunité innée et acquise. L'IL-15, produite par les monocytes/macrophages (M ϕ) et les cellules dendritiques, active (\rightarrow) les fonctions des cellules NK, des lymphocytes T et B, des mastocytes et des cellules T de l'immunité innée (NK-T, I-IEL et DETC). Ceci inclut la stimulation des fonctions effectrices des lymphocytes T, l'activation fonctionnelle des cellules NK et la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B. L'IL-15 active également les fonctions des monocytes/M ϕ et des neutrophiles (voir sections 2.5.2.4 et 4.7.5) et augmente la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. Ces effets permettent de classer l'IL-15 comme une cytokine pro-inflammatoire.

2.5.2.1 Cellules NK

La liaison de l'IL-15 à son récepteur entraîne la phosphorylation rapide du récepteur et l'activation de différentes protéines intracellulaires. Dans les cellules NK, l'IL-15 active certains membres de la voie de signalisation Jak-STAT, i.e. Jak-1, Jak-3, STAT-3 et STAT-5 (Yu *et al.*, 1998). De plus, l'IL-15 induit l'activation de la phospholipase C β via MAPK et de la protéine kinase C ϵ (PKC ϵ), en plus d'inhiber l'activité de la PKC α (Ponti *et al.*, 2002; Vitale *et al.*, 2002). L'activation de la signalisation intracellulaire des cellules NK par l'IL-15 entraîne l'augmentation de l'activité cytotoxique, de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC – *antibody-dependent cellular cytotoxicity*), de la chimiotaxie, de l'adhésion et de la réponse anti-virale (Carson *et al.*, 1994; Allavena *et al.*, 1997; Atedzoe *et al.*, 1997; Fawaz *et al.*, 1999; Gosselin *et al.*, 1999). L'IL-15 peut également, seule ou en combinaison avec d'autres cytokines comme l'IL-12 et l'IL-18, stimuler la production de cytokines (IFN- γ , TNF- α et GM-CSF) et de chimiokines (CCL3/MIP-1 α et CCL4/MIP-1 β) par les cellules NK (Carson *et al.*, 1994; Fehniger *et al.*, 1999). Il a même été démontré que l'IL-15 est essentiel, de concert avec l'IL-12, pour une production optimale d'IFN- γ par les cellules NK (Carson *et al.*, 1995).

2.5.2.2 Lymphocytes T

L'IL-15 est un chimioattractant des cellules T (Wilkinson et Liew, 1995; Weninger *et al.*, 2001). Celle-ci induit la redistribution de CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), CD43 (leukosialin) et CD44 (H-CAM) dans les uropodes des lymphocytes T (Nieto *et al.*, 1996). L'IL-15 participe également à leur migration à travers l'endothélium en modulant l'interaction entre les molécules d'adhésion CD11a/CD18 (LFA-1) et CD54 (Oppenheimer-Marks *et al.*, 1998; Sancho *et al.*, 1999). L'IL-15 peut également agir indirectement sur la migration des lymphocytes T en augmentant l'expression de différentes chimiokines ainsi que leurs récepteurs (Perera *et al.*, 1999).

Tout comme dans les cellules NK, l'IL-15 active Jak-1, Jak-3, STAT-3 et STAT-5 dans les lymphocytes T (Johnston *et al.*, 1995a; Lin *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1998). Il a également été montré que l'IL-15 induit l'activation de Syk et son association physique à l'IL-15R α , ainsi que l'activation de la kinase p56lck, de la molécule adaptatrice Gab2, de l'IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*), de la voie métabolique Ras/Raf/MAP (ERK) kinase et du facteur de transcription NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) (Johnston *et al.*, 1995b; Adunyah *et al.*, 1997; Gadina *et al.*, 2000; Bulanova *et al.*, 2001; Eicher, 2003). Il a été montré que l'IL-15 active les fonctions des lymphocytes T, plus particulièrement les fonctions cytotoxiques et cytolytiques des lymphocytes T CD8⁺. En effet, l'IL-15 induit la sécrétion de TNF- α , d'IFN- γ , de granzyme B et de perforine par les cellules T CD8⁺ (Kanegane et Tosato, 1996; Ye *et al.*, 1996; Kasyapa *et al.*, 1999; Khan et Casciotti, 1999; Ishimitsu *et al.*, 2001; Yajima *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Klebanoff *et al.*, 2004; Yajima *et al.*, 2005). L'IL-15 diminue toutefois l'expression de son propre récepteur de haute affinité sur les lymphocytes T, suggérant l'existence d'un mécanisme de régulation dans ces cellules (Kumaki *et al.*, 1996).

2.5.2.3 Lymphocytes B

L'IL-15 semble pouvoir moduler les fonctions des lymphocytes B pré-activés seulement. En effet, l'IL-15 induit la prolifération des lymphocytes B co-stimulés par des anticorps anti-IgM, par le PMA, par CD154 (CD40 Ligand) ou par des dinucléotides cytosine phospho guanine (CpG) non-méthylés d'origine bactérienne (Armitage *et al.*, 1995). L'IL-15 provoque également la production d'IgM, d'IgG1 et d'IgA (Hiroi *et al.*, 2000; Bernasconi *et al.*, 2002). Contrairement à ses effets sur les lymphocytes B pré-activés d'individus normaux, l'IL-15 entraîne directement la prolifération des cellules B cancéreuses provenant de patients atteints de leucémies, telles que la leucémie lymphoïde chronique B ou la leucémie à tricholeucocytes (*hairy cell leukemia*) (Trentin *et al.*, 1996). Il a été montré que la signalisation intracellulaire dans le lymphocyte B s'effectue par l'association physique de l'IL-15R α avec la kinase Syk. Cette association induit la phosphorylation de l'IL-15R α , de Syk et de la phospholipase C γ (Bulanova *et al.*, 2001).

2.5.2.4 Monocytes/macrophages et cellules dendritiques

La stimulation des monocytes par l'IL-15 induit la sécrétion des chimiokines CXCL8/IL-8 et de CCL2/MCP-1, ayant respectivement une activité chimiotactique envers les neutrophiles et les monocytes (Badolato *et al.*, 1997). De plus, l'activation des TLR2/1 (*toll-like receptor*) à la surface des monocytes, en combinaison avec l'IL-15, entraîne leur différenciation en macrophages (Krutzik *et al.*, 2005). L'IL-15 induit également l'expression de TNF- α , d'IL-1, d'IL-6, d'IL-10, d'IFN- β et d'iNOS par les macrophages, en plus d'augmenter leur activité antivirale (Alleva *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004). L'IL-15 est également un facteur de différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques et des monocytes en cellules dendritiques (DC – *dendritic cells*) (Bykovskaia *et al.*, 1999; Mohamadzadeh *et al.*, 2001; Saikh *et al.*, 2001). L'importance de l'IL-15 dans les fonctions des macrophages et des DC au niveau de l'immunité innée a été démontrée par l'utilisation de souris déficientes pour l'expression de l'IL-15, CD122 et CD132. En effet, la production d'IL-12, d'oxyde nitrique (NO – *nitric oxide*) et d'IFN- γ par les DC et les macrophages de ces souris étaient inhibées, tout comme l'augmentation de l'expression de la molécule CMH de classe II et de CD40 (Ohteki *et al.*, 2001).

2.5.2.5 Mastocytes

Contrairement aux membres de la voie de signalisation Jak-STAT activés par l'IL-15 dans les cellules NK et T, c'est-à-dire Jak-1, Jak-3, STAT-3 et STAT-5, l'IL-15 active plutôt Jak-2, Tyk-2, STAT-3, STAT-5, STAT-6 ainsi que la kinase Syk dans les mastocytes (Tagaya *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 2000; Bulanova *et al.*, 2003). Il a été montré que l'IL-15 agit comme un facteur de croissance des mastocytes, en plus d'induire la production d'IL-4 (Tagaya *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 2000). Ainsi, étant donné que les mastocytes jouent un rôle protecteur lors des infections aux parasites dans les muqueuses, l'IL-15 pourrait possiblement participer à cette protection en augmentant la prolifération et l'activation des mastocytes (Yoshikai et Nishimura, 2000).

2.5.3 Inhibiteur général de l'apoptose

Il a été démontré que l'IL-15 est un inhibiteur *in vitro* de l'apoptose des lymphocytes (B et T), des DC et des mastocytes (Bulfone-Paus *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 1999; Pirtskhalaishvili *et al.*, 2000; Masuda *et al.*, 2001; Tourkova *et al.*, 2002; Judge *et al.*, 2002; Berard *et al.*, 2003). L'IL-15 est aussi un facteur de survie pour les cellules NK. Toutefois, l'incubation prolongée de l'IL-15 avec de l'IL-12 induit plutôt l'apoptose des cellules NK. Ceci suggère que les cytokines qui servent à activer la réponse immunitaire innée peuvent également la limiter en induisant l'apoptose des cellules impliquées (Ross et Caligiuri, 1997; Carson *et al.*, 1997; Biber *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2002). Bulfone-Paus et ses collaborateurs (1997) ont également montré que l'administration *in vivo* d'IL-15 permet d'inhiber complètement le phénomène d'apoptose multi-systémique létale induit par l'injection d'un anticorps anti-Fas chez la souris (Bulfone-Paus *et al.*, 1997). Il a été suggéré que l'IL-15 agirait comme un facteur anti-apoptotique en entraînant, entre autre, la relocalisation d'une protéine effectrice de l'apoptose, TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), à la chaîne IL-15R α . Ainsi, l'IL-15 empêcherait la liaison de TRAF2 au récepteur TNFR1 puisque l'IL-15R α et le TNFR1 possèdent un site de liaison homologue à TRAF2 (Bulfone-Paus *et al.*, 1999; Pereno *et al.*, 1999; Pereno *et al.*, 2000). L'IL-15 est donc considérée comme un inhibiteur général de l'apoptose *in vivo* et *in vitro*.

2.5.4 Effets de l'IL-15 sur les cellules et tissus d'origine non hématopoïétique

L'IL-15 affecte également des tissus et des cellules qui ne font pas partie du système immunitaire. Il a été montré que l'IL-15 est un agent anabolique du muscle squelettique, en plus de stimuler la différenciation des cellules musculaires (Quinn *et al.*, 1995; Quinn *et al.*, 1997; Furmanczyk et Quinn, 2003). L'administration d'IL-15 chez des rongeurs influence la masse adipeuse, l'angiogénèse ainsi que la vasodilatation et la vasoconstriction (Baker et Abel, 1995; Angiolillo *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 2002; Quinn

et al., 2005). Les cellules neuronales expriment également l'IL-15 et son récepteur. Ceci suggère que cette cytokine pourrait jouer un rôle dans le développement et la physiologie du cerveau ou encore agir comme un facteur de régulation neuroimmunologique dans le système nerveux central (Hanisch *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 1998; Kurowska *et al.*, 2002b).

2.6 Utilisations thérapeutiques possibles de l'IL-15

2.6.1 Adjuvant dans le traitement des infections bactériennes et virales

Dans un modèle murin du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), les souris produisent peu d'IL-15, les rendant ainsi susceptibles aux infections mycobactériennes (Umemura *et al.*, 2001a). De plus, il a été noté que les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) possèdent des niveaux sériques faibles d'IL-15, comparativement aux personnes séronégatives (Ahmad *et al.*, 2003). Or, il a été observé que l'ajout d'IL-15 *in vitro* permet de stimuler les fonctions effectrices des cellules du système immunitaire de patients atteints du VIH (Chehimi *et al.*, 1997; Agostini *et al.*, 1997; Mastroianni *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2003; Castelli *et al.*, 2004). L'administration d'IL-15 dans divers modèles murins augmente également la protection contre *Mycobacterium bovis*, *Salmonella choleraesuis*, *Plasmodium falciparum*, *Cryptococcus neoformans* et le virus de l'herpès simplex (Nishimura *et al.*, 1996; Elloso *et al.*, 1998; Mody *et al.*, 1998; Tsunobuchi *et al.*, 2000; Umemura *et al.*, 2001b; Gill *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent donc la possibilité d'utiliser l'IL-15 comme un adjuvant pour la stimulation du système immunitaire lors d'une infection au VIH ou d'autres infections d'origine bactérienne et virale.

2.6.2 Applications anti-tumorales

L'IL-15 augmente l'activité anti-tumorale contre différents types de mélanomes en stimulant l'activité des cellules NK et/ou la réponse cytotoxique des lymphocytes T (Yajima *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002; Brentjens *et al.*, 2003; Klebanoff *et al.*, 2004;

Kobayashi *et al.*, 2005). De plus, l'injection dans une souris de différents mélanomes génétiquement modifiés pour sécréter de l'IL-15, seule ou en combinaison avec d'autres cytokines, entraîne un retard de la croissance de la tumeur ou son rejet complet par l'activation des cellules NK et/ou des cellules T CD8⁺ (Hazama *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2001; Comes *et al.*, 2002; Kishida *et al.*, 2003; Lasek *et al.*, 2004). L'IL-15 possède également des propriétés pharmacologiques intéressantes, tel que démontré par l'injection intraveineuse d'IL-15 dans des souris ayant reçu des implants tumoraux. L'IL-15, en comparaison à l'IL-2, s'accumule plus efficacement sur les cellules tumorales cibles, en plus d'être éliminé plus rapidement de la circulation sanguine (Kobayashi *et al.*, 2000). Malgré ses propriétés uniques et ses applications possibles dans l'immunothérapie des cancers, l'IL-15 demeure une cytokine utilisée seulement dans des tests pré-cliniques et n'a encore jamais été administrée à des humains.

2.7 Rôle de l'IL-15 dans les maladies inflammatoires, auto-immunes et le cancer

Le système de contrôle complexe qui gère la synthèse et la sécrétion de l'IL-15 suggère que la production excessive de la cytokine soit dangereuse pour l'organisme. Ceci se reflète dans les différentes maladies où l'IL-15 joue un rôle important, tant au niveau du développement qu'au niveau de la progression.

2.7.1 Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une maladie dégénérative chronique des membranes synoviales caractérisée par l'inflammation des articulations (principalement les articulations synoviales périphériques). Cette inflammation est attribuable, entre autre, à l'accumulation de lymphocytes T, de neutrophiles et de macrophages dans le fluide synovial et aux niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-15 et le TNF- α) retrouvés dans le liquide synovial (Patel et Haynes, 2001).

2.7.1.1 Détection de l'IL-15

L'IL-15 a été détectée dans les fluides et tissus synoviaux, les nodules rhumatoïdes, ainsi que dans le sérum de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Les concentrations détectées dans les fluides synoviaux varient de 10 pg/mL à plus de 1200 ng/mL (McInnes *et al.*, 1996; Thurkow *et al.*, 1997; Klimiuk *et al.*, 2001; Cordero *et al.*, 2001; Gonzalez-Alvaro *et al.*, 2003; Raza *et al.*, 2005). Les fibroblastes et les macrophages synoviaux ainsi que les cellules endothéliales semblent être les principales sources d'IL-15 (Oppenheimer-Marks *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 1999; Kurowska *et al.*, 2002a; Cho *et al.*, 2004).

2.7.1.2 Effets de l'IL-15

L'incubation de lymphocytes T avec les fluides synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde a permis de montrer que ces fluides induisent la chimioattraction et l'activation des cellules T. Ces effets étaient partiellement réduits par l'ajout d'anticorps anti-IL-15 (McInnes *et al.*, 1996; al-Mughales *et al.*, 1996). De plus, l'IL-15 induit la sécrétion des chimiokines CXCL12/SDF-1 et CCL3/MIP-1 α par les cellules T CD4⁺ synoviaux, ainsi que l'augmentation de leurs récepteurs respectifs à la surface de ces mêmes cellules. Ces chimiokines pourraient donc être impliquées dans le recrutement des lymphocytes T CD4⁺ au niveau des articulations (Nanki *et al.*, 2000; Wang et Liu, 2003). L'IL-15 augmente également la migration transendothéliale des cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans un modèle d'arthrite *in vivo* (Oppenheimer-Marks *et al.*, 1998). Il a été montré que les lymphocytes T synoviaux activés par l'IL-15 sécrètent du TNF- α (McInnes *et al.*, 1997). Ces lymphocytes T activés stimulent également la production de TNF- α par les macrophages et les fibroblastes synoviaux par un mécanisme dépendant du contact intercellulaire (Cho *et al.*, 2004). L'élimination des cellules T par l'injection d'un anticorps anti-CD2 dans un modèle d'arthrite chez la souris a d'ailleurs permis de réduire considérablement la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et IL-15) et de métalloprotéinases de la matrice impliquées dans la destruction des tissus, i.e. MMP-1 et MMP-2 (Klimiuk *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que le micro-environnement synovial contenant de l'IL-15 est à la fois un chimioattractant et un

régulateur des fonctions des lymphocytes T dans les articulations des patients atteints d'arthrite rhumatoïde.

Outre les lymphocytes T, l'IL-15 peut également activer d'autres types cellulaires présents dans les articulations. En effet, l'IL-15, seule ou en combinaison avec l'IL-18, induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-17 et IFN- γ) et d'enzymes impliquées dans la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde, comme la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la MMP-9, dans les cellules synoviales (Gracie *et al.*, 1999; Ziolkowska *et al.*, 2000; Constantinescu *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2004; Hwang et Kim, 2005; Kim *et al.*, 2005b). L'IL-15 est également responsable de l'activation continue, de la prolifération et de la résistance à l'apoptose des fibroblastes synoviaux (Kurowska *et al.*, 2002a). L'IL-15 stimule aussi le développement des ostéoclastes, cellules importantes dans le remaniement et la résorption des os, suggérant un rôle possible de l'IL-15 dans la destruction des os observée chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Ogata *et al.*, 1999).

2.7.1.3 Régulation de l'IL-15 pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde

L'administration de la forme soluble de l'IL-15R α ou d'une protéine de fusion IL-15/Fc agissant comme un antagoniste permet de prévenir le développement d'arthrite induit par le collagène dans un modèle murin (Ruchatz *et al.*, 1998; Ferrari-Lacraz *et al.*, 2004). De plus, le méthotrexate, un traitement immunosuppresseur couramment utilisé chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, permet de réduire la production de TNF- α induite par l'IL-15 et prévient le développement d'arthrite dans ce même modèle (Neurath *et al.*, 1999). Le méthotrexate diminue également la sécrétion de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-17 par les lymphocytes T ainsi que la sécrétion d'IL-15, de CXCL-8/IL-8 et d'IL-6 par les fibroblastes synoviaux (Miranda-Carus *et al.*, 2004). La cyclosporine A, un autre immunosuppresseur utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, diminue la production d'IL-15 et de TNF- α par les fibroblastes synoviaux (Cho *et al.*, 2002). Dans une étude clinique de phase I/II, l'administration d'un anticorps monoclonal humain anti-IL-15 (HuMax-IL-15) développé par GenMab présente des effets thérapeutiques très

encourageants dans le traitement à court terme de l'arthrite rhumatoïde. En effet, son efficacité paraît égale à celle des inhibiteurs du TNF- α (Baslund *et al.*, 2005). Le blocage de l'IL-15 ou encore l'administration de médicaments modulant la sécrétion d'IL-15 s'avère donc une cible de choix pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde.

2.7.2 Maladies pulmonaires

2.7.2.1 Sarcoïdose

La sarcoïdose ou maladie de Besnier-Boeck-Scaumann est une affection inflammatoire d'étiologie inconnue qui affecte progressivement de multiples organes et plus particulièrement les poumons. Elle est caractérisée par la présence de granulomes (zones de tissus inflammatoires) à l'intérieur de l'organisme (sur les parois des bronches et bronchioles par exemple) ou sous forme de lésions sur la peau (Nakano *et al.*, 2005). Il a été suggéré que l'IL-15 pourrait être impliqué dans la pathogénèse de la sarcoïdose. En effet, contrairement aux personnes saines, les macrophages alvéolaires des patients atteints par cette maladie expriment l'IL-15 au niveau de la membrane et du cytoplasme, ce qui entraîne la sécrétion d'IFN- γ et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ pulmonaires (Agostini *et al.*, 1996; Agostini *et al.*, 1999). Ces résultats indiquent un rôle de l'IL-15 dans l'activation de populations cellulaires présentes dans les voies respiratoires des patients atteints de sarcoïdose.

2.7.2.2 Bronchite, asthme et autres

Des niveaux élevés d'IL-15 membranaire ont été détectés à la surface des macrophages et des neutrophiles dans d'autres maladies pulmonaires, tels que la bronchite chronique, la tuberculose et l'asthme (Muro *et al.*, 2001; Komai-Koma *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que les macrophages alvéolaires sécrètent de l'IL-15 dans la tuberculose, la pneumonie et l'alvéolite fibreuse cryptogénique (Zissel *et al.*, 2000; Muro *et al.*, 2001). Finalement, la stimulation avec différents agents des cellules épithéliales humaines fraîchement isolées des bronches ou de la lignée épithéliale pulmonaire A549 augmente

leur synthèse et/ou leur sécrétion d'IL-15 (Stoeck *et al.*, 1998; Stoeck *et al.*, 2000; Ge *et al.*, 2004).

2.7.3 Maladies inflammatoire chroniques de l'intestin

Les deux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin les plus communes sont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Il a été montré que les patients atteints de l'une ou l'autre de ces maladies ont une augmentation du pourcentage de cellules mononucléées du sang périphérique exprimant l'IL-15, pourcentage qui diminue lors du traitement efficace des symptômes (Kirman et Nielsen, 1996). L'IL-15 a également été détectée dans les tissus provenant de la muqueuse rectale, ainsi que dans les macrophages, les cellules mononucléées et les cellules épithéliales des muqueuses (Sakai *et al.*, 1998; Vainer *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Nishiwaki *et al.*, 2005). L'IL-15 peut induire la production d'IFN- γ et TNF- α par les lymphocytes T, ainsi que l'activation et la prolifération des cellules mononucléées et des cellules B productrices d'IgG de la paroi intestinale (Sakai *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Nishiwaki *et al.*, 2005). L'IL-15 peut donc être impliqué dans la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin en activant les cellules immunitaires des muqueuses.

2.7.4 Autres maladies inflammatoire et auto-immunes

Une production élevée d'IL-15 a été détectée dans diverses maladies, incluant différentes formes d'hépatite, des maladies musculaires inflammatoires (polymyosite et dermatomyosite), le lupus érythémateux systémique, l'athérosclérose, la sclérose systémique, la sclérose en plaques, le diabète auto-immun et les dermatoses bulleuses (Kakumu *et al.*, 1997; Kivisakk *et al.*, 1998; Pashenkov *et al.*, 1999; D'Auria *et al.*, 1999; Wuttge *et al.*, 2001; Aringer *et al.*, 2001; Tokushige *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 2002; Blanco-Jerez *et al.*, 2002; Wallstrom *et al.*, 2003; Lukic *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Le rôle exact de l'IL-15 dans le développement et la progression de ces maladies reste encore à être déterminé.

2.7.5 Cancers

L'IL-15 a été détecté dans différentes tumeurs et lignées cancéreuses et un rôle dans la propagation des tumeurs lui serait attribué (Doucet *et al.*, 1997; Tinhofer *et al.*, 2000; Kukita *et al.*, 2002; Kuniyasu *et al.*, 2003; Gravisaco *et al.*, 2003). De fait, il a été démontré que l'IL-15 agit comme un facteur de croissance et de survie pour les cellules provenant de différents types de cancer, dont l'ATL, le lymphome cutané, le néoplasme des cellules NK, le cancer colorectal, la leucémie myéloïde aiguë, le myélome multiple, la leucémie lymphoïde B chronique et la leucémie à tricholeucocytes (Trentin *et al.*, 1996; Meazza *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1998; Tinhofer *et al.*, 2000; Kuniyasu *et al.*, 2001; Kukita *et al.*, 2002; Yamasaki *et al.*, 2004). L'augmentation de protéines anti-apoptotiques et l'activation constitutive de différents facteurs de transcription seraient impliquées dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses par l'IL-15 (Qin *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2001). De plus, l'IL-15 produite par les cellules tumorales permet de diminuer l'expression de surface de la molécule HLA de classe I, molécule qui est impliquée dans la reconnaissance de cellules de mélanome par le système immunitaire (Barzegar *et al.*, 1998). Il a également été suggéré que la prostaglandine E₂ (PGE₂), un médiateur immunosuppresseur sécrété dans l'environnement tumoral, inhibe l'activation des fonctions des cellules NK par l'IL-15 en diminuant l'expression de la chaîne CD132 à leur surface (Joshi *et al.*, 2001). L'IL-15 peut donc jouer un rôle autant dans la prolifération et la propagation tumorale que dans les mécanismes d'évasion tumorale de la surveillance du système immunitaire.

3. L'interleukine-21

3.1 Découverte de la cytokine et de son récepteur

L'IL-21 et son récepteur spécifique ont récemment été découverts par deux équipes. L'équipe de Ozaki (2000) a identifié l'IL-21R α par le criblage d'un chromosome artificiel bactérien (*bacterial artificial chromosome*) correspondant au chromosome 16p12 et a provisoirement appelé ce nouveau récepteur NILR (*novel interleukin receptor*) (Ozaki *et al.*, 2000). L'équipe de Parrish-Novak (2000) a quant à elle identifié l'IL-21R α par le criblage d'une banque d'EST (*expressed sequence tag*) et a localisé le récepteur sur le chromosome humain 16p11. Le milieu de culture de plus de 100 lignées cellulaires différentes (primaires et immortalisées) a ensuite été utilisé pour stimuler la lignée cellulaire BaF3 exprimant ce nouveau récepteur. Un facteur de prolifération provenant du milieu de culture de cellules T CD3⁺ activées par les agents mitogènes PMA/ionomycine a été identifié, purifié et désigné IL-21 (Parrish-Novak *et al.*, 2000).

3.2 Caractéristiques de l'IL-21

3.2.1 Gène

Le gène de 5 exons codant pour l'IL-21 humaine est situé sur le chromosome 4q26-27 à 180 kb du gène codant pour l'IL-2. La présence des gènes de l'IL-21, de l'IL-2 et de l'IL-15 dans la même région chromosomale (le gène de l'IL-15 est situé sur le chromosome 4q31) et un emplacement similaire de leurs introns suggèrent que ces trois gènes pourraient provenir de la duplication d'un même gène (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Parrish-Novak *et al.*, 2002).

3.2.2 Structure

L'IL-21 possède une certaine homologie avec l'IL-15 puisque les formes humaines de ces deux cytokines partagent 25% d'acides aminés identiques au niveau de leur séquence. L'ADNc de l'IL-21 code pour un précurseur polypeptidique de 162 acides aminés. La forme mature de l'IL-21 consiste en un polypeptide de 131 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 15 kDa (Parrish-Novak *et al.*, 2000).

3.2.3 Distribution

L'ARNm de l'IL-21 a été détecté dans les lymphocytes T CD4⁺, mais est absent dans les cellules CD8⁺, les lymphocytes B CD19⁺, les monocytes CD14⁺ et les cellules dendritiques (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 2003a). L'expression protéique de l'IL-21 semble restreinte aux lymphocytes T CD4⁺ activés par le PMA ou par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Parrish-Novak *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été démontré que l'IL-21 était préférentiellement exprimé par les cellules T CD4⁺ différenciées en un phénotype Th2 (Wurster *et al.*, 2002).

3.2.4 Mécanismes de régulation

Il a été montré qu'une mobilisation de calcium est suffisante pour induire la sécrétion d'IL-21 par les lymphocytes T préactivés (Kim *et al.*, 2005a). De plus, l'expression d'IL-21 par les cellules T CD4⁺ de type Th2 résulte de la liaison spécifique du facteur de transcription NF-ATc2 au promoteur de l'IL-21. Dans les cellules de type Th1, l'activation du facteur de transcription T-bet (*T-box expressed in T cells*) diminue la transcription de l'IL-21 en inhibant la liaison de NF-ATc2 au promoteur (Mehta *et al.*, 2005).

3.3 Caractéristiques de l'IL-21R

3.3.1 Gène

Le gène de 9 exons codant pour l'IL-21R α est situé sur le chromosome 16 chez l'humain et est adjacent à l'IL-4R α (Parrish-Novak *et al.*, 2000). L'IL-21R α humaine possède une certaine homologie avec CD122 (29% d'identité, 46% de similarité) (Ozaki *et al.*, 2000).

3.3.2 Structure

L'analyse de la séquence en acides aminés de la portion cytoplasmique révèle la présence de motifs *Box 1* et *Box 2*, des sites de liaison des kinases Jak et de six résidus tyrosine. De plus, la tyrosine carboxy-terminale est située à l'intérieur d'un motif YXXQ, un site de liaison potentiel pour les facteurs de transcription STAT. La masse moléculaire calculée de l'IL-21R α est de 60 kDa. La protéine possède plusieurs sites de glycosylation potentiels et sa masse moléculaire observée varie de 60 à 100 kDa (Ozaki *et al.*, 2000).

3.3.3 Distribution

L'ARNm de l'IL-21R α est détectable par hybridation de type Northern dans les tissus lymphoïdes, incluant les lymphocytes du sang périphérique, la rate et le thymus (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Ozaki *et al.*, 2000). La forme protéique de l'IL-21R α est exprimée par différents types cellulaires dont les cellules B, T (CD4⁺ et CD8⁺), NK et dendritiques et son expression peut être modulée lors de l'activation des cellules (Ozaki *et al.*, 2000; Parrish-Novak *et al.*, 2002; Strengell *et al.*, 2004).

3.3.4 Liaison de l'IL-21 à son récepteur

Lors de la liaison de l'IL-21 à son récepteur, la partie intracytoplasmique de l'IL-21R α s'homodimérise et se lie à la chaîne CD132, composante indispensable de l'IL-21R (Ozaki *et al.*, 2000; Asao *et al.*, 2001; Habib *et al.*, 2002). Il a été montré que l'IL-21 se lie à un épitope de la chaîne CD132 qui chevauche l'épitope de liaison de l'IL-4 (Zhang *et al.*, 2003).

3.4 Effets biologiques de l'IL-21

3.4.1 Développement du système immunitaire

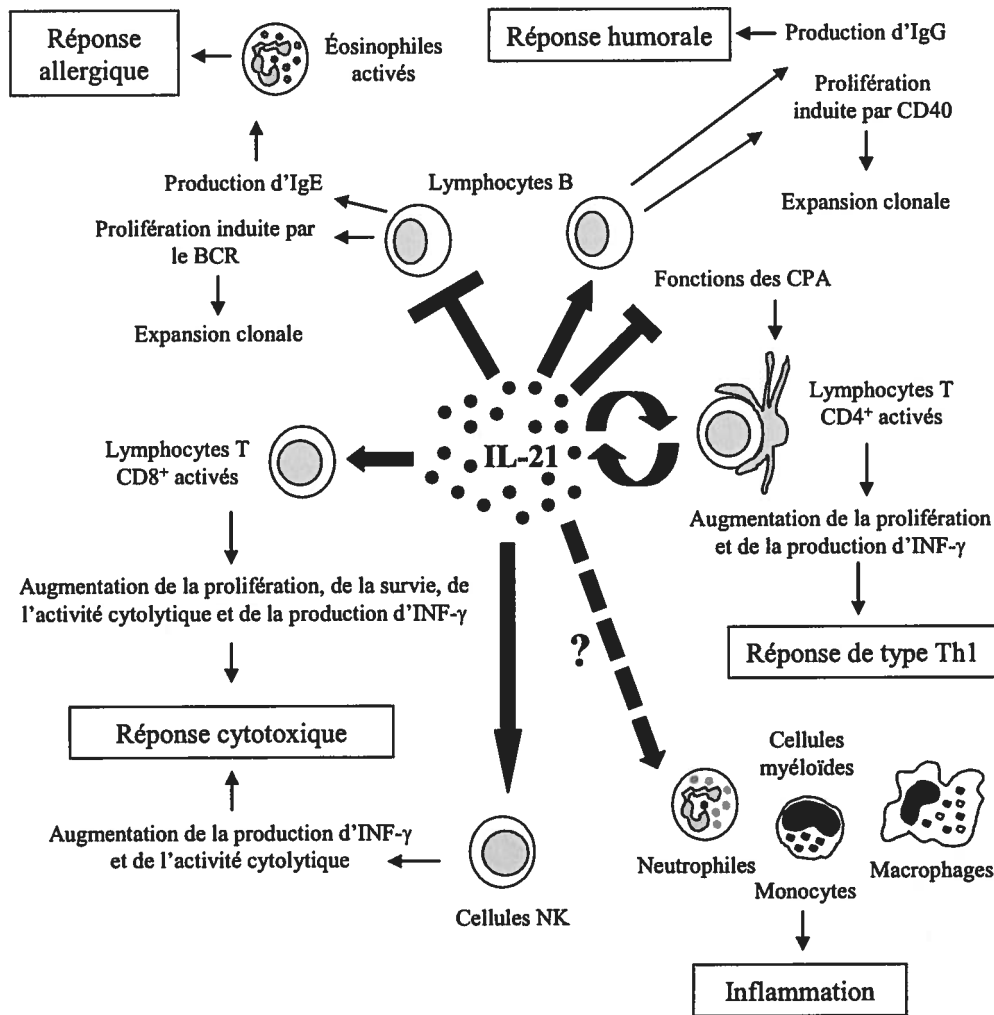
La génération de souris déficientes pour l'IL-21R α (IL-21R $\alpha^{-/-}$) a permis de montrer que l'IL-21 n'est pas essentiel à l'hématopoïèse. Ces souris sont viables et fertiles et présentent un développement normal des compartiments lymphoïde et myéloïde (Kasaian *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002). L'IL-21 semble toutefois jouer un rôle important dans la régulation de la production d'immunoglobulines, tel que le démontre les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ et les souris transgéniques surexprimant l'IL-21 (**tableau II**) (Ozaki *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2004).

3.4.2 Cellules du système immunitaire

L'IL-21 joue un rôle important dans la modulation des fonctions du système immunitaire. Il a été montré que l'IL-21 module les fonctions des lymphocytes B, des lymphocytes T, des cellules NK et des cellules dendritiques (Habib *et al.*, 2003). Les effets pléiotropiques de l'IL-21 semblent dépendre du type cellulaire et de son état de différenciation et d'activation. Il a même été suggéré que l'IL-21 serait un régulateur-clé dans la transition entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire acquise (Kasaian *et al.*, 2002). La **figure 5** résume les effets de l'IL-21 sur les différentes cellules du système immunitaire.

TABEAU II: PHÉNOTYPE DES SOURIS TRANSGÉNIQUES SUREXPRESSANT L'IL-21 OU DÉFICIENTES POUR L'EXPRESSION DE L'IL-21R α

Mutation	Phénotype	Références
IL-21R α ^{-/-}	<p>Développement normal des compartiments lymphoïde et myéloïde</p> <p>Aucune différence au niveau du nombre et/ou de l'analyse phénotypique des érythrocytes, thymocytes, splénocytes, monocytes, granulocytes, lymphocytes, cellules NK et cellules de la moelle osseuse comparativement aux souris de type sauvage</p> <p>Niveaux sériques élevés d'IgE</p> <p>Niveaux sériques faibles d'IgG1 et d'IgG2b</p>	<p>Kasaian <i>et al.</i>, 2002;</p> <p>Ozaki <i>et al.</i>, 2002</p>
Tg IL-21 murine	<p>Retard au niveau de la croissance</p> <p>Lymphopoièse et érythropoièse réduites</p> <p>Augmentation de cellules myéloïdes dans la rate et la moelle osseuse</p> <p>Accumulation de neutrophiles et macrophages dans de multiples tissus</p> <p>Décès avant d'atteindre la maturité sexuelle</p>	<p>Parrish-Novak <i>et al.</i>, 2002;</p> <p>Ozaki <i>et al.</i>, 2004;</p> <p>Allard <i>et al.</i>, 2004</p>
Tg IL-21 humaine	<p>Augmentation du nombre de cellules B immatures et de plasmocytes</p> <p>Diminution du nombre de cellules B matures</p> <p>Augmentation des niveaux sériques d'IgG1 et d'IgM</p>	<p>Ozaki <i>et al.</i>, 2004</p>



(inspiré de Habib *et al.*, 2003)

Figure 5 : Effets biologiques de l'IL-21 : régulateur-clé dans la transition entre la réponse immunitaire innée et acquise. L'IL-21, produite par les lymphocytes T CD4⁺, active (\rightarrow) ou inhibe (\perp) les fonctions des lymphocytes B, des lymphocytes T, des cellules NK et des cellules dendritiques. Elle est impliquée, entre autre, dans la stimulation des fonctions effectrices des lymphocytes T, l'activation fonctionnelle des cellules NK et la régulation de la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B. Le rôle de l'IL-21 dans l'activation des cellules de type myéloïde (neutrophiles, monocytes et macrophages) et son rôle potentiel dans l'inflammation sont encore inconnus.

3.4.2.1 Cellules NK

Il a été montré que l'IL-21 agit en synergie avec l'IL-15 et FL/Flt3-L (*FMS-like tyrosine kinase 3-ligand*) afin d'augmenter la prolifération et la différenciation des progéniteurs CD34⁺ en cellules NK (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Sivori *et al.*, 2003). De plus, la liaison de l'IL-21 à son récepteur entraîne l'activation de la voie Jak-STAT dans les cellules NK, plus précisément les membres Jak-1, Jak-3, STAT-1, STAT-3 et STAT-4 (Strengell *et al.*, 2002; Strengell *et al.*, 2003). L'IL-21 augmente également la prolifération et les fonctions effectrices des cellules NK matures, tout en potentialisant leur production d'IFN- γ par un mécanisme indépendant de NF- κ B (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Kasaian *et al.*, 2002; Sivori *et al.*, 2003; Strengell *et al.*, 2003; Toomey *et al.*, 2003; Vollmer *et al.*, 2005). Par contre, l'IL-21 peut restreindre l'activation des cellules NK en inhibant l'expansion des cellules naïves tout en augmentant l'apoptose des cellules matures. Cette propriété de l'IL-21 permet donc de limiter la réponse innée (Kasaian *et al.*, 2002; Brady *et al.*, 2004).

3.4.2.2 Lymphocytes T

Dans les lymphocytes T, il a été montré que l'IL-21 active Jak-1, Jak-3, STAT-1, STAT-3, STAT-4 et STAT-5 (Asao *et al.*, 2001; Strengell *et al.*, 2002; Strengell *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 2005). De plus, l'IL-21 stimule la prolifération des cellules T dans des conditions de co-stimulation avec un anticorps anti-CD3, l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, mais n'a aucun effet sur leur prolifération en absence d'un signal de co-stimulation (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Eberl *et al.*, 2002a). L'IL-21 ne semble toutefois pas essentielle à une réponse maximale de prolifération induite par le TCR, puisque les lymphocytes d'une souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ prolifèrent normalement suite à la liaison du TCR (Kasaian *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002). Il a été suggéré que l'IL-21 soit à la fois un régulateur négatif et positif de l'expansion clonale des lymphocytes T et ce, selon l'isoforme du TCR. Il a été montré que l'IL-21 favorise la différenciation des cellules T d'isoforme TCR $\gamma\delta$ vers le phénotype mémoire alors qu'elle inhibe complètement la différenciation induite par l'IL-15 des cellules CD8⁺ (TCR d'isoforme $\alpha\beta$) vers le type mémoire (Kasaian *et al.*, 2002; Eberl *et al.*, 2002b). Il a été montré que l'IL-21 augmente la transcription de

nombreux gènes impliqués dans l'immunité innée, i.e. CD25, IL-12R β 2, IL-18R et T-bet, et stimule la production d'IFN- γ par les lymphocytes T (Strengell *et al.*, 2002; Strengell *et al.*, 2003). Toutefois, l'IL-21 inhibe le développement des cellules productrices d'IFN- γ de type Th1, suggérant que cette cytokine permet d'amplifier une réponse de type Th2 (Wurster *et al.*, 2002). L'IL-21, seule ou en combinaison avec l'IL-15, augmente aussi les fonctions cytotoxiques des cellules CD8⁺ et augmente leur production d'IFN- γ (Kasaian *et al.*, 2002; van Leeuwen *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003; Di Carlo *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2005).

3.4.2.3 Lymphocytes B

Il a été montré que l'IL-21 stimule les membres de la voie de signalisation Jak-STAT dans les lymphocytes B, plus précisément Jak-1, Jak-3, STAT-1, STAT-3 et STAT-5 (Habib *et al.*, 2002; Suto *et al.*, 2002). L'IL-21 active également ERK1/2, mais pas NF- κ B (Brenne *et al.*, 2002; Suto *et al.*, 2002). Il a été montré que l'IL-21 augmente, d'une part, la prolifération induite par un anticorps anti-CD40 (mimant l'interaction CD40-CD154 entre les cellules B et T) et inhibe, d'autre part, la prolifération induite par l'IL-4 et un anticorps anti-IgM (mimant l'activation du BCR) (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Ozaki *et al.*, 2004). L'IL-21 joue également un rôle important dans la régulation de la production d'immunoglobulines et de la permutation de classes. En effet, l'IL-21 induit la différenciation de cellules B en plasmocytes et augmente la production d'IgG tout en inhibant celle d'IgE (Kasaian *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2002; Suto *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2004; Ozaki *et al.*, 2004; Pene *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2004). L'IL-21 peut également induire l'apoptose des cellules B activées (Mehta *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2004). Ainsi, selon un modèle proposé par Jin et ses collaborateurs (2004), l'IL-21 jouerait un rôle-clé dans l'élaboration d'une réponse efficace par les cellules B. D'une part, l'IL-21 maintiendrait la tolérance du soi en activant l'apoptose des lymphocytes B autoréactifs et, d'autre part, entraînerait la prolifération, la différenciation et la production d'IgG par les lymphocytes B recevant des signaux de co-stimulation (Jin *et al.*, 2004).

3.4.2.4 Cellules dendritiques

Il a été montré que l'IL-21 inhibe la maturation fonctionnelle des cellules dendritiques. En effet, la présence d'IL-21 lors de la différenciation *in vitro* de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse a pour effet de générer des cellules dendritiques avec un phénotype immature. Il a été montré que ces cellules dendritiques sont incapables d'induire une hypersensibilité de contact médiée par les cellules T et d'entraîner la prolifération des cellules T CD8⁺ (Brandt *et al.*, 2003a; Brandt *et al.*, 2003b). Ces cellules dendritiques immatures, mais fonctionnelles, pourraient jouer un rôle dans l'induction de l'anergie ou dans la régulation de la différenciation des lymphocytes T naïfs vers un phénotype suppresseur (Mehta *et al.*, 2004).

3.4.2.5 Cellules myéloïdes

Les effets de l'IL-21 sur les cellules myéloïdes sont peu connus. Il a été montré que l'IL-21R α est exprimé par les macrophages provenant du tissu synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Jungel *et al.*, 2004). De plus, chez les souris transgéniques surexprimant l'IL-21, il y a accumulation de neutrophiles et de macrophages dans certains tissus, ainsi qu'une augmentation de cellules myéloïdes dans la rate et dans la moelle osseuse (observations non publiées décrites dans Parrish-Novak *et al.*, 2002). Finalement, l'analyse de souris transgéniques surexprimant la forme murine de l'IL-21 sous le contrôle du promoteur de CMH de classe I démontre la présence d'une population de cellules myéloïdes immatures dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi qu'une lymphopoïèse et une érythropoïèse réduites, entraînant la mort de 75% des souris durant les deux premières semaines de leur vie (Allard *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent un rôle possible de l'IL-21 dans la différenciation des précurseurs hématopoïétiques vers la lignée myéloïde et également leur activation.

3.5 Utilisations thérapeutiques possibles de l'IL-21

3.5.1 Traitement des allergies et de l'asthme

Une étude intéressante a montré que l'administration *in vivo* de l'IL-21 à des souris immunisées avec de l'ovalbumine entraînait une diminution de la production d'IgE et du recrutement d'éosinophiles dans les voies respiratoires des souris ayant inhalés de l'ovalbumine (Suto *et al.*, 2002). Ainsi, comme la production d'IgE et le recrutement d'éosinophiles sont impliqués dans les allergies et l'asthme, leur régulation par l'IL-21 est d'intérêt thérapeutique pour le traitement de ces maladies (Ozaki *et al.*, 2002; Hamid *et al.*, 2003; Shakoory *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2004).

3.5.2 Applications anti-tumorales

Il a été montré que l'IL-21 favorise le développement d'une immunité anti-tumorale en stimulant l'activité des cellules NK et/ou des lymphocytes T CD8⁺ (Wang *et al.*, 2003; Kishida *et al.*, 2003; Moroz *et al.*, 2004; Brady *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2005). De plus, comme dans le cas de l'IL-15, l'injection dans une souris de différents mélanomes génétiquement modifiés pour sécréter de l'IL-21, seule ou en combinaison avec d'autres cytokines, entraîne un retard de la croissance de la tumeur ou son rejet complet par l'activation des cellules NK et/ou des cellules T CD8⁺ (Ugai *et al.*, 2003b; Ma *et al.*, 2003; Ugai *et al.*, 2003a; Di Carlo *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2004). Les propriétés anti-tumorales de l'IL-21 ont d'ailleurs incité la compagnie Novo Nordisk à effectuer des essais cliniques sur l'humain. Une étude de phase I/II sur une quarantaine de personnes atteintes d'un mélanome de la peau a débuté en septembre 2004 en Australie. La compagnie entrevoit également utiliser l'IL-21 dans le traitement d'un carcinome rénal (Novo Nordisk, 2004).

3.6 Rôle de l'IL-21 dans les maladies inflammatoires, auto-immunes et le cancer

L'expression de l'IL-21 semble importante pour le développement d'une réponse immunitaire adéquate. La production excessive de cette cytokine peut toutefois être néfaste, puisque l'IL-21 serait impliquée dans certaines maladies inflammatoires et auto-immunes ainsi que dans certains types de cancer.

3.6.1 Arthrite rhumatoïde

Il a été démontré que l'IL-21R α est exprimé par les fibroblastes et les macrophages dans le synovium de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. L'expression du récepteur est associée au phénotype activé des fibroblastes synoviaux. L'IL-21 n'a toutefois pas été détectée dans le liquide synovial (Jungel *et al.*, 2004). Dans un modèle d'arthrite chez la souris et le rat, l'ARNm de l'IL-21R α a été détecté au niveau des cellules épidermales, des fibroblastes, des macrophages, des synoviocytes, des ostéoblastes et des lymphocytes. Aucune expression de l'ARNm de l'IL-21R α n'a été détectée dans les neutrophiles. Une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-21 dans les macrophages et les lymphocytes, mais pas dans les neutrophiles, a également été observée deux semaines après l'immunisation avec du collagène. L'injection d'un récepteur soluble qui neutralise l'activité biologique de l'IL-21 a permis de réduire considérablement les signes cliniques de l'arthrite chez la souris et le rat, i.e. diminution significative de l'inflammation sévère dans les pattes et diminution de la prolifération et de la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T activés (Young *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que le blocage de l'IL-21 ou de son récepteur pourrait constituer une cible intéressante pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde.

3.6.2 Sclérose systémique

La sclérose systémique ou sclérodermie est une maladie caractérisée par une production excessive de collagène au niveau de la peau et des organes internes. L'infiltration de collagène dans les poumons, les intestins, le coeur ou les reins cause le durcissement de

ceux-ci et entraîne une diminution de leurs fonctions (Tamby *et al.*, 2003). L'IL-21R α a été détecté dans l'épiderme de patients atteints de sclérose systémique, plus spécifiquement au niveau des kératinocytes. De plus, le récepteur était co-exprimé avec le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), responsable de la morphologie altérée des vaisseaux sanguins de la peau (Distler *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que la signalisation par l'IL-21R α pourrait contribuer à la pathogénèse de la sclérose systémique.

3.6.3 Maladie de Crohn

La maladie de Crohn est caractérisée par la présence d'une inflammation chronique dans l'appareil digestif. Les lymphocytes activés de type Th1 jouent un rôle central dans la pathogénèse de la maladie, de par la production de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-12 qui entraînent les dommages tissulaires observés chez les patients (Bouma et Strober, 2003). Il a récemment été suggéré que l'IL-21 pourrait contribuer à la pathogénèse de la maladie de Crohn. L'IL-21 a en effet été détecté aux sites inflammatoires des patients et son expression est augmentée en présence d'IL-12. De plus, la neutralisation de l'IL-21 diminue la phosphorylation de STAT4 et T-bet, inhibant du même coup la production d'IFN- γ (Monteleone *et al.*, 2005). Ainsi, l'IL-21 pourrait contribuer à la réponse soutenue des cellules Th1 dans la maladie de Crohn.

3.6.4 Diabète auto-immun

L'expression de niveaux élevés d'IL-21 et d'IL-21R α par les cellules T activées a récemment été observée chez la souris NOD (*nonobese diabetic*), un modèle de diabète auto-immun. Il a été suggéré que l'IL-21 entraîne l'apoptose de la majorité des cellules T exprimant l'IL-21R α menant à la lymphopénie observée chez ces mêmes souris. Par ailleurs, les cellules T exprimant un TCR de forte avidité pour un antigène, par exemple les cellules autoréactives contre des antigènes exprimés par les îlots pancréatiques, échappent à l'apoptose induite par l'IL-21. Ces cellules activées par l'IL-21 profitent d'une baisse de compétition pour des cellules présentatrices d'antigène, ce qui entraîne

l'émergence de cellules effectrices pouvant réagir contre le soi. La production excessive d'IL-21 favoriserait donc le développement de l'auto-immunité (King *et al.*, 2004; Gallegos et Bevan, 2004; Marleau et Sarvetnick, 2005). Une production excessive de l'IL-21 a également été observée dans un autre type de maladie auto-immunitaire, le lupus érythémateux (Ozaki *et al.*, 2004; Vinuesa *et al.*, 2005).

3.6.5 Cancers

L'IL-21 pourrait jouer un rôle dans certains types de cancer. L'IL-21 serait un facteur de croissance et de survie pour le myélome multiple, c'est-à-dire une néoplasie des plasmocytes (Brenne *et al.*, 2002). Le gène codant pour l'IL-21R α a également été associé aux translocations de BCL-6 dans le lymphome diffus de grosses cellules B (*diffuse large B-cell lymphoma*). Ainsi, l'expression de l'IL-21R α dans ces cellules pourrait promouvoir l'expression inappropriée du gène transloqué de BCL-6, conduisant à la tumorigénèse (Ueda *et al.*, 2002). L'expression d'un IL-21R α fonctionnel par les lymphocytes T de patients atteints de l'ATL suggère également un rôle à l'IL-21 dans la pathophysiologie de cette leucémie (Ueda *et al.*, 2005).

4. Les neutrophiles

4.1 Le développement des neutrophiles

4.1.1 L'hématopoïèse

Le processus responsable de la production des cellules sanguines se nomme l'hématopoïèse. L'hématopoïèse embryonnaire est extramédullaire de la 3^e à la 20^e semaine de développement, d'abord localisée dans la vésicule vitelline puis dans le foie. Cette dernière débute à la 5^e semaine de développement et est essentiellement orientée vers l'érythropoïèse (90% des cellules hématopoïétiques matures du foie fœtal sont des érythroblastes). Ce n'est qu'à partir de la 15^e semaine de développement que la moelle osseuse prend le relais du foie fœtal et devient hématopoïétique. L'hématopoïèse chez l'homme adulte a ainsi lieu dans la moelle osseuse au niveau des cavités osseuses (sternum, côtes, vertèbres, sacrum, os longs) (Tavian et Peault, 2005). On retrouve trois types majeurs de cellules dans la moelle osseuse : les cellules souches pluripotentes ou multipotentes, les cellules progénitrices et les cellules matures ou en voie de le devenir. Les cellules pluripotentes ont la capacité de se diviser et de se différencier en cellules sanguines de toutes les lignées. Les cellules progénitrices peuvent proliférer et se différencier en une lignée spécifique alors que les cellules matures ou en voie de le devenir sont différenciées en un type cellulaire particulier. La prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques sont assurées par des facteurs de stimulation spécifique : les facteurs de croissance hématopoïétiques (*colony-stimulating factors - CSF*) et les interleukines. Le GM-CSF, le G-CSF, le M-CSF, ainsi que l'IL-3 (également appelé multi-CSF ou hématopoïétine multi-spécifique), l'IL-5, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-11, KL (*c-kit ligand* ou *stem-cell factor*) et l'érythropoïétine sont quelques-uns de ces régulateurs de l'hématopoïèse. Selon les différents facteurs de régulation affectant les cellules souches pluripotentes, celles-ci se différencient en cellules myéloïdes ou lymphoïdes (Metcalf, 1993; Vose et Armitage, 1995; Barreda *et al.*, 2004).

4.1.2 La production de neutrophiles

Le processus d'hématopoïèse dans la moelle osseuse génère majoritairement des neutrophiles. En effet, une personne normale produit environ $0,9 \times 10^9$ neutrophiles/kg de poids corporel/jour et la réserve de neutrophiles dans le sang est renouvelée environ 2,3 fois par jour. La concentration sanguine se situe entre 3 et 5×10^6 neutrophiles/mL. (Cannistra et Griffin, 1988; Edwards, 1994). La production de neutrophiles peut cependant augmenter dramatiquement (jusqu'à 10 fois) dans le cas d'une infection ou d'un stress (Boggs, 1967). Les neutrophiles ne subsistent que de 4 à 10 heures dans la circulation sanguine, à moins qu'ils ne soient recrutés vers les tissus (Bicknell *et al.*, 1994). L'activation des neutrophiles et la présence de différents facteurs au site inflammatoire peuvent augmenter leur demie-vie d'une à deux journées. En absence d'infection ou de stress, les neutrophiles meurent par apoptose et sont éliminés par les macrophages dans les poumons, la rate et le foie (Bicknell *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2001; Brazil *et al.*, 2005).

4.1.3 Les étapes de maturation des neutrophiles

La présence de G-CSF, GM-CSF, M-CSF, KL, IL-3 et IL-6 va induire la différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules progénitrices de la lignée neutrophilique puis en neutrophiles matures. En moyenne, 14 jours sont nécessaires pour la division et la maturation des cellules progénitrices en neutrophiles matures (Cartwright *et al.*, 1964). Les cellules vont alors acquérir les phénotypes de myéloblastes, de promyélocytes, de myélocytes, de métamyélocytes puis de neutrophiles immatures dits « band » avant de devenir des neutrophiles matures ou segmentés (Cartwright *et al.*, 1964; Bainton *et al.*, 1971; Metcalf, 1993). Les myéloblastes sont des cellules très peu différenciées qui ont la capacité de proliférer et qui possèdent un gros noyau ovale ainsi qu'un cytoplasme dépourvu de granules. Ce premier stade de différenciation est suivi de deux étapes avec synthèse de granules : les promyélocytes et les myélocytes. Les promyélocytes sont caractérisés par l'acquisition d'un grand nombre de granules appelés azurophiliques ou primaires et contenant la myéloperoxydase. Les myélocytes sont quant à eux caractérisés

par la synthèse et l'accumulation des granules spécifiques ou secondaires. La mitose est encore possible pour les myélocytes, mais les granules primaires sont réparties également entre les cellules-filles issues de cette division. Les métamyélocytes et les neutrophiles « band » sont incapables de se diviser et ne synthétisent plus aucun granule. Ils sont identifiables par la forme du noyau, leur contenu en granules et la présence de peu de mitochondries. Ces cellules se développent en neutrophiles matures, caractérisés par leur noyau multilobé de deux à quatre segments et leur cytoplasme contenant du glycogène et des granules (entre 200 et 300 granules, avec deux fois plus de granules spécifiques que de granules azurophiliques). Sur 100 cellules nucléées produites dans la moelle osseuse, 2% sont des myéloblastes, 5% des promyélocytes, 12% des myélocytes, 22% des métamyélocytes et des neutrophiles « band » et 20% des neutrophiles matures. Ainsi, environ 60% des cellules nucléées produites dans la moelle osseuse appartiennent à la lignée des neutrophiles (Bainton et Farquhar, 1968; Bainton *et al.*, 1971). La **figure 6** schématise le cycle biologique des neutrophiles, de leur développement dans la moelle osseuse jusqu'à leur élimination par les macrophages.

4.2 Les fonctions des neutrophiles

4.2.1 La chimiotaxie

Lors de l'inflammation, les neutrophiles sont attirés au foyer inflammatoire par des chimioattractants ou substances chimiotactiques. Parmi ces composés, on retrouve des chimiokines, dont CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO α /KC, CXCL2/GRO β /MIP-2, CXCL3/Gro γ et CXCL5/ENA-78, qui sont libérées par les leucocytes, les cellules endothéliales, les plaquettes et certaines espèces bactériennes (Yoshimura *et al.*, 1987; Balkwill et Burke, 1989; Balentien *et al.*, 1990; Walz *et al.*, 1991; Geiser *et al.*, 1993; Gijssbers *et al.*, 2005). En présence de chimioattractants, les neutrophiles vont ralentir puis rouler sur la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins par un mécanisme dépendant de l'interaction des sélectines et des hydrates de carbone à la surface des neutrophiles et des cellules endothéliales. Par exemple, les neutrophiles se lient faiblement aux hydrates de carbone de l'endothélium via CD62L (sélectine-L) et, inversement, les cellules

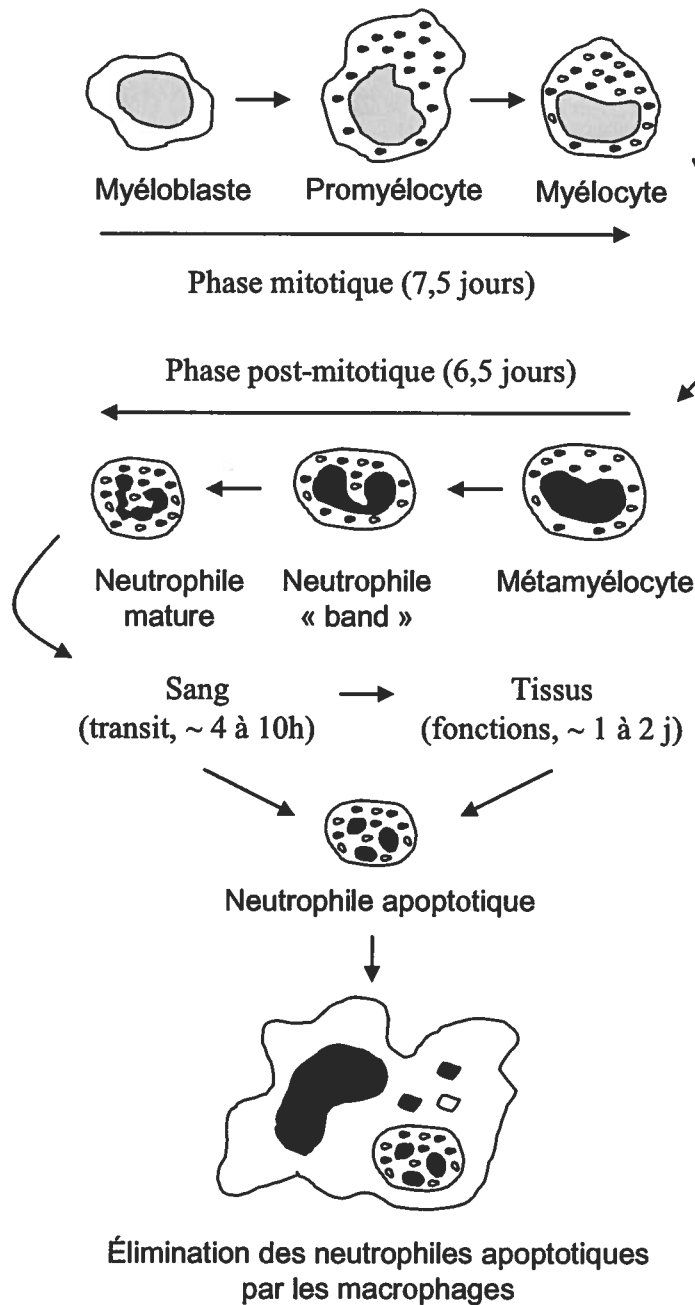


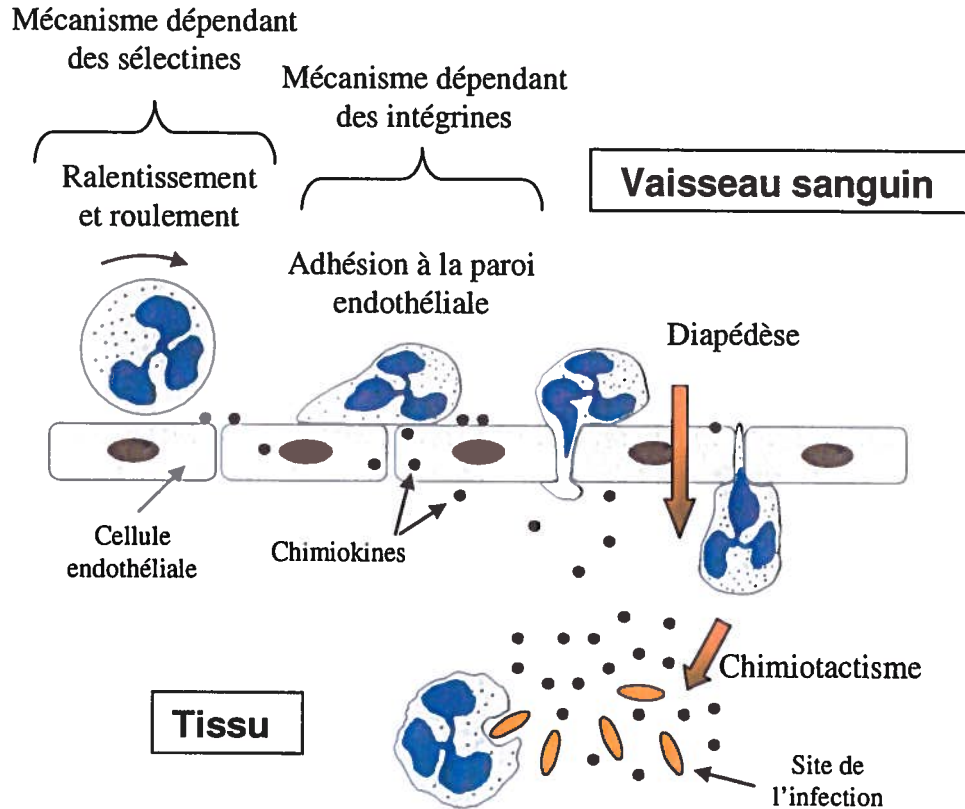
Figure 6 : Représentation du cycle biologique des neutrophiles. Les stades de développement de la lignée neutrophilique dans la moelle osseuse sont les myéloblastes, les promyélocytes, les myélocytes, les métamyélocytes, les neutrophiles immatures dits « band » et les neutrophiles matures. Les neutrophiles transitent alors par le sang, où ils ne subsistent que de 4 à 10 heures, à moins d’être recrutés par les tissus. L’activation des fonctions des neutrophiles et la présence de différents facteurs au site inflammatoire peuvent augmenter leur demie-vie d’une à deux journées. En absence d’infection ou de stress, les neutrophiles meurent par apoptose et sont éliminés par les macrophages dans les poumons, la rate et le foie.

endothéliales se fixent à certains hydrates de carbone des neutrophiles comme CD15s (sialyl-Lewis x) via CD62P (sélectine-P) et CD62E (sélectine-E) (Polley *et al.*, 1991). Les chimiokines libérées par les cellules environnantes vont alors induire l'activation des neutrophiles et la régulation de leurs intégrines, indispensables à une liaison solide à l'endothélium. Parmi ces intégrines, notons CD11a/CD18 (LFA-1) et CD11b/CD18 (Mac-1) qui permettent l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales exprimant CD50 (ICAM-1) et CD54 (ICAM-3) (Tonnesen, 1989; Smith, 1993). Survient finalement la diapédèse, où les neutrophiles projettent des pseudopodes (prolongements cytoplasmiques) dans les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales afin de se glisser dans l'ouverture en se déformant. Les neutrophiles continuent ensuite leur migration vers le site d'infection en suivant le gradient de chimioattractants (**figure 7**) (Huber *et al.*, 1998-1999).

4.2.2 La phagocytose

La phagocytose est le plus important mécanisme de défense de l'hôte contre les microenvahisseurs. Ce processus par lequel les particules sont éliminées du milieu extracellulaire est propre à plusieurs types cellulaires, tels l'épithélium pigmenté de l'œil, les cellules dendritiques de la peau et les cellules de Kupffer du foie. Il existe toutefois des phagocytes dits « professionnels » dont la phagocytose est la principale fonction. Les neutrophiles et les macrophages font partie de ces cellules (Lennartz, 1999).

La première étape dans le processus de phagocytose est la reconnaissance et l'attachement de la particule ou du microorganisme à la surface de la cellule. La reconnaissance du corps étranger est grandement augmentée par la présence d'opsonines, c'est-à-dire des molécules qui se fixent sur les microorganismes et qui les rendent plus propices à être phagocytés. Parmi les opsonines, on retrouve les immunoglobulines, les fragments du complément, la fibronectine et certaines protéines de la phase aiguë (comme la protéine C-réactive). Les neutrophiles et les monocytes/macrophages possèdent à leur surface une variété de récepteurs utiles pour la phagocytose, parmi lesquels le récepteur mannose, les récepteurs pour les fragments C3b et iC3b du complément et les récepteurs



(adapté de Male, 1999)

Figure 7 : Étapes de la migration des neutrophiles dans les tissus. Les neutrophiles, en présence de chimioattractants, vont d'abord ralentir puis rouler sur la paroi endothéliale par l'interaction des sélectines et des hydrates de carbone à la surface des neutrophiles et des cellules endothéliales. Les neutrophiles vont ensuite adhérer à la paroi endothéliale par l'interaction entre les intégrines des neutrophiles et les molécules d'adhésion des cellules endothéliales. Les cellules vont finalement transmigrer par le phénomène de diapédèse en se comprimant dans l'interstice entre des cellules adjacentes. Les neutrophiles continuent alors de migrer en direction du site de l'infection en suivant le gradient de chimioattractants. Les neutrophiles vont activer leur arsenal bactéricide et tenter d'éliminer les microorganismes présents.

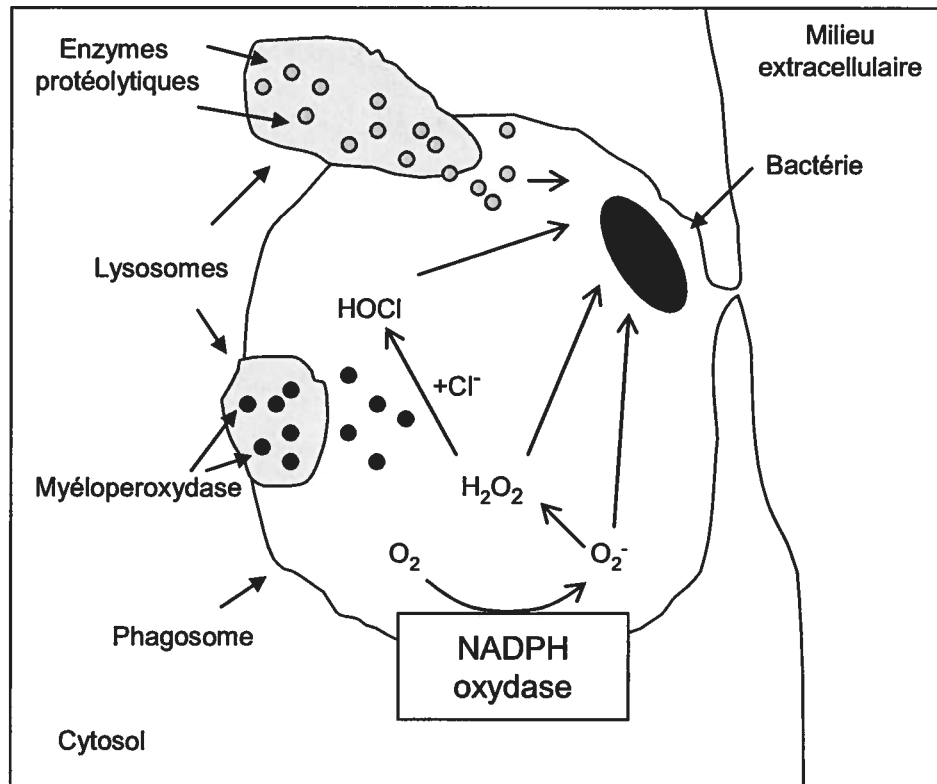
pour le fragment Fc des IgGs (Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII) (Lennartz, 1999; Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Après la fixation du pathogène à la surface de la cellule, des pseudopodes peuvent être formés autour de la particule afin d'internaliser le corps étranger. Le pathogène sera éventuellement englouti dans une vésicule phagocytaire dérivée de la membrane

cellulaire appelée phagosome. Les granules cytoplasmiques (les lysosomes) vont fusionner avec cette vésicule afin de former un phagolysosome. Ces granules contiennent des enzymes capables de générer des métabolites réactifs dérivés de l'oxygène et de l'azote ainsi que des enzymes protéolytiques, des enzymes hydrolytiques et des peroxydases. La NADPH oxydase (génère des anions superoxydes (O_2^-)), la myéloperoxydase (génère de l'acide hypochloreux (HOCl)), l'élastase, le lysozyme, la gélatinase et les défensines sont des exemples de protéines contenues dans ces granules. Suite à la formation du phagolysosome, le contenu des granules est relâché à l'intérieur de la vésicule afin d'attaquer les membranes, les protéines et les acides nucléiques des microorganismes dans le but de les éliminer (Lennartz, 1999; Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; El-Benna *et al.*, 2005). Il a été montré que la génération de O_2^- par la NADPH oxydase requiert des protons contenus dans la vacuole, ce qui élève le pH à un niveau optimal pour les protéases neutres. Ces protéases sont également activées par les ions K^+ qui pénètrent dans la vacuole afin de compenser la perte de protons. Le milieu hypertonique ainsi créé entraîne la solubilisation des protéases cationiques de la matrice des granules. La nécessité d'un environnement alcalin et hypertonique permet également de restreindre la toxicité de ces protéines au compartiment vacuolaire, limitant ainsi les dommages aux tissus environnants (Segal, 2005). La **figure 8** illustre l'activation de l'arsenal bactéricide du neutrophile lors de la phagocytose.

4.2.3 La synthèse de cytokines et de chimiokines

Les neutrophiles matures ont traditionnellement été caractérisés comme étant des cellules terminalement différenciées n'ayant peu ou pas la capacité de synthétiser de l'ARN et des protéines. En effet, la durée de vie relativement courte des neutrophiles, le peu de réticulum endoplasmique et de ribosomes et la nature condensée de la chromatine semblait indiquer que le noyau n'était pas transcriptionnellement actif. Aujourd'hui, il est reconnu que les neutrophiles matures sont capables d'effectuer la biosynthèse des protéines et que cette biosynthèse peut être rapidement augmentée dans le cadre d'une réponse inflammatoire (Cassatella, 1999; Witko-Sarsat *et al.*, 2000). En plus de synthétiser



(inspiré de Edwards, 1994)

Figure 8 : Schématisation de l'activation de l'arsenal bactéricide du neutrophile lors de la phagocytose. Suite à la reconnaissance d'Ig à la surface d'un pathogène par le neutrophile, ce dernier va tenter de l'éliminer en effectuant la phagocytose. Des pseudopodes peuvent se former afin d'internaliser le corps étranger. C'est lors de la fusion du phagosome avec des lysosomes contenant des enzymes capables de générer des métabolites réactifs dérivés de l'oxygène et de l'azote (la NADPH oxydase et la myéloperoxydase génèrent des anions superoxydes O_2^- , du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et de l'acide hypochloreux HOCl par exemple) ainsi que des enzymes protéolytiques, des enzymes hydrolytiques et des peroxydases que le pathogène sera détruit.

des macromolécules participant directement à leurs fonctions effectrices, les neutrophiles expriment une panoplie de cytokines et chimiokines. Parmi ces cytokines, on retrouve des cytokines pro-inflammatoires (comme $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ et $IL-12$) et des cytokines anti-inflammatoires (comme l'antagoniste du récepteur à l' $IL-1$ - $IL-1Ra$ et le $TGF-\beta$ - *transforming growth factor- β*) (Tiku *et al.*, 1986; Grotendorst *et al.*, 1989; Dubravec *et al.*, 1990; Lord *et al.*, 1991; Cassatella *et al.*, 1995). Les neutrophiles expriment

également des chimiokines de la famille C-X-C (comme CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO α et CXCL10/IP-10) et de la famille C-C (comme CCL3/MIP-1 α et CCL4/MIP-1 β) (Bazzoni *et al.*, 1991; Kasama *et al.*, 1993; Kasama *et al.*, 1994; Gasperini *et al.*, 1995; Cassatella *et al.*, 1997). La production de certaines cytokines et chimiokines ne représente souvent que 10 à 20% du niveau de production par les monocytes (pour un même nombre de cellules). Toutefois, comme les neutrophiles sont les premières cellules à migrer vers un site inflammatoire et, généralement, en nombre élevé, cette production peut être suffisante pour prolonger la réponse inflammatoire. Ces cytokines et chimiokines peuvent promouvoir le recrutement de nouveaux neutrophiles, mais également l'accumulation et l'activation subséquente des monocytes/macrophages, éosinophiles et lymphocytes au site inflammatoire.

4.3 La lignée cellulaire HL-60 : un modèle pour l'étude de la myélopoïèse

Les cellules ayant généré la lignée HL-60 ont été isolées du sang périphérique d'un individu atteint de leucémie promyélocytaire aiguë (Collins *et al.*, 1977). Ces cellules sont caractérisées par leur morphologie de myéloblastes et de promyélocytes, la présence de lysozyme (marqueur enzymatique des leucocytes de la lignée neutrophilique et monocytique), l'absence de marqueurs lymphoïdes, leur faible activité phagocytaire et chimiotactique ainsi que l'expression de récepteurs de surface pour les fragments Fc des immunoglobulines et le complément (Gallagher *et al.*, 1979). Les cellules HL-60 ont la propriété de répondre à différents stimuli chimiques et d'acquérir un phénotype ressemblant à celui des neutrophiles, à celui des monocytes/macrophages, à celui des éosinophiles et même à celui des mégacaryocytes (Collins *et al.*, 1978; Collins *et al.*, 1980; Griffin *et al.*, 1982; Tanaka *et al.*, 1982; Murao *et al.*, 1983; Fischkoff *et al.*, 1984; Tomonaga *et al.*, 1986).

Certains composés polaires, comme le diméthyl sulfoxyde – DMSO, et les dérivés de l'acide rétinoïque permettent aux cellules HL-60 d'acquérir un phénotype de neutrophile (Collins *et al.*, 1978; Breitman *et al.*, 1980). Le phénotype mature des cellules HL-60 différenciées en neutrophile a été démontré par une variété de marqueurs de

différenciation. Ces derniers incluent des changements morphologiques (apparition d'un noyau segmenté), l'augmentation ou réduction des fonctions (augmentation de la phagocytose et de la chimiotaxie et réduction de la prolifération), la modulation de l'expression de récepteurs de surface (expression de CD11b et CD15) et l'apparition ou la disparition de certaines protéines (diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, augmentation de l'expression de Fas et acquisition des membres gp91phox, p67phox et p47phox du complexe de la NADPH oxydase) (Collins *et al.*, 1978; Gallagher *et al.*, 1979; Newburger *et al.*, 1984; Harris et Ralph, 1985; Collins, 1987; Rosmarin *et al.*, 1989; Delia *et al.*, 1992; Trayner *et al.*, 1998; Hua *et al.*, 2000; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000; Hauert *et al.*, 2002; Tsiftoglou *et al.*, 2003). L'un des tests de différenciation des HL-60 les plus couramment utilisé est le test de réduction du bleu de tétrazolium. En effet, lorsque les cellules HL-60 acquièrent le phénotype de neutrophile, elles ont la capacité de réduire le bleu de tétrazolium grâce à la génération d'anions superoxydes par le complexe nouvellement formé de la NADPH oxydase (Collins *et al.*, 1980; Hua *et al.*, 2000). La différenciation des HL-60 entraîne également leur apoptose spontanée via l'augmentation de l'expression des caspases et de la sensibilité à la voie de signalisation apoptotique Fas (CD95), démontrant ainsi leur similitude aux neutrophiles (Martin *et al.*, 1990; Watson *et al.*, 1997; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000; Vondracek *et al.*, 2001). Il semblerait toutefois que le DMSO et les dérivés de l'acide rétinoïque induisent la différenciation des cellules HL-60 selon des voies de signalisation distinctes. En effet, des différences ont été observées au niveau des fonctions des cellules différenciées en un phénotype de neutrophile par ces différents agents. Il a été démontré que le DMSO et les dérivés de l'acide rétinoïque induisent de manière semblable la phagocytose, l'adhésion et la production de réactifs dérivés de l'oxygène, mais que des réponses atténuées sont obtenues pour les cellules HL-60 différenciées par les dérivés de l'acide rétinoïque en ce qui a trait à la chimiotaxie envers le fMLP (Matzner *et al.*, 1987; Sham *et al.*, 1995). Il a été montré que les protéines G ne se lient pas aux récepteurs des peptides formylés dans les cellules HL-60 différenciées par les dérivés de l'acide rétinoïque (Erbeck *et al.*, 1993). De plus, il a été montré que la différenciation des cellules HL-60 par le DMSO induit l'expression de la GPI-80, une protéine qui s'associe aux intégrines, alors que la différenciation par les dérivés de l'acide

rétinoïque ne l'induit pas (Takeda *et al.*, 2003). Ainsi, l'utilisation du DMSO et des dérivés de l'acide rétinoïque lors de la différenciation des cellules HL-60 peut permettre d'étudier les molécules impliquées dans la chimiotaxie des granulocytes.

La forme active de la vitamine D₃ (1,25- α -dihydroxyvitamine D₃) permet la différenciation des cellules HL-60 vers un phénotype de monocyte alors que le PMA induit plutôt leur différenciation en un phénotype de macrophage (Tanaka *et al.*, 1982; Murao *et al.*, 1983). Selon l'agent chimique utilisé, les cellules vont acquérir l'expression de différents marqueurs enzymatiques (lysozyme pour les deux phénotypes) et marqueurs de surface (CD11b pour les deux phénotypes et CD14 pour le phénotype de monocyte seulement) ainsi qu'une modulation de leurs fonctions (baisse de la prolifération pour les deux phénotypes et augmentation de la phagocytose et de l'adhésion pour le phénotype de macrophage seulement) (Huberman et Callahan, 1979; Harris et Ralph, 1985; Collins, 1987; Wang *et al.*, 1991; Trayner *et al.*, 1998; Tsiftoglou *et al.*, 2003). Les cellules HL-60 représentent donc un modèle intéressant pour étudier les mécanismes impliqués dans la différenciation, la maturation et les fonctions des neutrophiles et des monocytes/macrophages.

4.4 Le modèle inflammatoire de la poche d'air : étude de la chimiotaxie *in vivo*

L'injection sous-cutanée d'air stérile dans le dos des rongeurs, principalement les rats et les souris, entraîne la formation d'une poche d'air. Cette technique, développée par Hans Selye, permet la formation d'une cavité où il est possible d'étudier les processus inflammatoires suite à l'injection de différents stimuli (Selye, 1953a; Selye, 1953b). Plusieurs avantages caractérisent le modèle de la poche d'air afin d'étudier les interactions cellulaires et leurs implications dans l'inflammation aiguë et chronique. En effet, cette technique est simple à exécuter et des analyses histologiques, biochimiques et cytologiques peuvent être faites sur les fluides et les tissus de la poche d'air (Dawson *et al.*, 1991).

Edwards et ses collaborateurs (1981) ont montré que l'injection d'air dans le dos d'un rongeur entraîne le développement d'une mince couche de tissu morphologiquement similaire à la membrane synoviale et ce, six jours suivant l'injection. Cette couche de tissus est composée, tout comme la membrane synoviale, de fibroblastes (50-90%) et de macrophages (10-50%) (Edwards *et al.*, 1981). De plus, les cellules de la poche, comme les cellules de la membrane synoviale, peuvent effectuer la phagocytose et produire une réponse inflammatoire à une multitude d'agents, caractérisée par un influx de cellules inflammatoires et un minimum d'exsudat (Kowanko *et al.*, 1986). Une étude de De Brito et collaborateurs (1988) a également montré que les mécanismes impliqués dans la réaction inflammatoire dans le modèle de la poche d'air sont les mêmes que ceux dans un modèle de polyarthrite induit par des adjuvants (De Brito *et al.*, 1988). Ceci suggère que la poche d'air est un modèle adéquat pour l'étude de la réponse inflammatoire par des agents impliqués dans les maladies des diarthroses (maladies rhumatismales).

Sous la couche de tissus de la poche, on retrouve majoritairement des neutrophiles 5 jours après la première injection d'air. Ces cellules sont beaucoup moins prédominantes après 8 jours et très rares après 14 jours (Edwards *et al.*, 1981). Le lavage de la poche d'air non stimulée montre que celle-ci contient très peu de cellules (~ 200 leucocytes/mm³). Ces cellules consistent en une population hétérogène de monocytes, macrophages, lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles et cellules géantes multinucléées (Kowanko *et al.*, 1986). Une réponse inflammatoire aiguë caractérisée par l'infiltration de neutrophiles et/ou de monocytes/macrophages dans la poche d'air peut être observée suite à l'injection d'un irritant. Le modèle d'air a, entre autre, été utilisé pour évaluer l'inflammation en réponse à la carraghénine (polysaccharide de l'algue *Chondrus crispus*), du zymosan (polysaccharide de *Saccharomyces cerevisiae*), à des bactéries atténuées (*Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*), à des toxines bactériennes (LPS), à des immunoglobulines agglomérées par la chaleur (complexes immuns), au dextran, à des cristaux d'acide urique et à des cytokines (CXCL8/IL-8, TNF- α et IFN- γ) (Sedgwick *et al.*, 1985; Kowanko *et al.*, 1986; Sedgwick et Lees, 1986; Hambleton et Miller, 1988; Forrest *et al.*, 1988; Ribeiro *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1991; Iida *et al.*, 1992; Tessier *et al.*, 1997; Cronstein *et al.*, 1999; Hachicha *et al.*, 1999; Clish *et al.*,

1999; Coates et McColl, 2001; Bochkov *et al.*, 2002). L'examen histologique de la membrane de la poche de souris ayant reçu un agent inflammatoire révèle des lésions inflammatoires typiques (dilatation vasculaire, œdème, margination et extravasation des leucocytes) ainsi que des macrophages et des neutrophiles qui tapissent l'intérieur de la poche (Kowanko *et al.*, 1986). Ces résultats indiquent que le modèle de la poche d'air permet l'étude du recrutement de leucocytes par des agents inflammatoires.

4.5 L'apoptose des neutrophiles

L'arsenal anti-microbien des neutrophiles n'est malheureusement pas sélectif et peut causer des dommages aux tissus normaux. La résolution de l'inflammation aiguë dépend donc de l'élimination des neutrophiles par apoptose, phénomène se produisant spontanément et en absence de stimuli externes, et de l'élimination de ces neutrophiles apoptotiques par les macrophages (Fadeel et Kagan, 2003).

4.5.1 Caractéristiques des neutrophiles apoptotiques

Lors de l'apoptose des neutrophiles, il y a diminution ou perte de l'expression de certains récepteurs de surface, tels CD16 (FcγRIIIb), CD32 (FcγRII), CD15 (Lewis x) et CD120b (TNF-RII), et de certaines molécules d'adhésion, tels CD50 (ICAM-3) et CD31 (PECAM-1) (Hart *et al.*, 2000). Il y a également exposition des résidus de phosphatidylsérine pour laquelle l'annexine-V possède une très grande affinité (Homburg *et al.*, 1995). La phosphatidylsérine est un phospholipide de la membrane plasmique localisé dans la couche interne de la membrane plasmique dans les cellules viables, mais qui est rapidement externalisé lors de l'activation de la mort programmée (Martin *et al.*, 1995). Il y a aussi condensation de la chromatine (visualisée par plusieurs noyaux pyknotiques) et sa fragmentation selon un motif caractéristique internucléosomal de 180 paires de bases (*DNA ladder*), en plus de la formation de vacuoles cytoplasmiques (Wyllie, 1985; Savill *et al.*, 1989a; Savill *et al.*, 1989b). Une autre caractéristique est le clivage par la caspase-3 d'une protéine du cytosquelette, la gelsoline, qui est, en partie, responsable des changements morphologiques (Kothakota *et al.*, 1997). Les neutrophiles,

contrairement aux autres cellules, ne font pas de corps apoptotiques, mais tendent plutôt à rapetisser (Savill *et al.*, 1989b). L'apoptose est également associée à une acidification intracellulaire, même si cette dernière n'est pas un événement essentiel à l'enclenchement du processus de mort programmée (Gottlieb *et al.*, 1995a; Gottlieb *et al.*, 1995b; Furlong *et al.*, 1997). Finalement, parmi les effets de l'apoptose sur le neutrophile, nous pouvons citer la diminution de la phagocytose, de la dégranulation et de l'activation de la flambée respiratoire. Cette diminution est caractérisée par la baisse de l'expression de gènes codants pour des protéines critiques à la réponse inflammatoire (Whyte *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 2003).

4.5.2 Régulation

Le processus d'apoptose est majoritairement régulé par les différents membres de la famille de Bcl-2 et de la famille des caspases. Une multitude de molécules peuvent également moduler positivement ou négativement la mort programmée des neutrophiles. Ces modulateurs comprennent des molécules de surface, des cytokines, des espèces réactives dérivées de l'oxygène, des hormones thyroïdiennes, des lectines et des toxiques de l'environnement (Faddeel *et al.*, 1998; Akgul *et al.*, 2001).

4.5.2.1 Les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2

La famille de Bcl-2 est maintenant reconnue comme jouant un rôle central dans le contrôle de l'apoptose (Adams et Cory, 1998). Cette famille de protéines peut être divisée en deux groupes : les protéines anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1/Bfl-1 et Mcl-1) et les protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bik, Bad, Bid et Bcl-x_S) (Reed, 1994; Kroemer, 1997; Breckenridge et Xue, 2004). Il a été démontré que les neutrophiles expriment une grande quantité de protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, dont Bad, Bak, Bax, Bid et Bik. La demie-vie de ces protéines est relativement longue et les niveaux cellulaires de leur expression varient très peu (Bazzoni *et al.*, 1999; Dibbert *et al.*, 1999; Weinmann *et al.*, 1999; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000; Moulding *et al.*, 2001; Cowburn *et al.*, 2002). Au contraire, il a été montré que les neutrophiles

expriment très peu de membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. L'ARNm codant pour Mcl-1, A1/Bfl-1, Bcl-x_L et Bcl-w a été détecté dans les neutrophiles, mais seule la présence de la protéine Mcl-1 a clairement été observée par différentes équipes (Moulding *et al.*, 1998; Weinmann *et al.*, 1999; Orlofsky *et al.*, 1999 ; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000; Moulding *et al.*, 2001; Epling-Burnette *et al.*, 2001b).

Mcl-1, comparativement aux autres membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, possède une demie-vie très courte (~3h) et un cycle de renouvellement rapide (*turnover*). Ceci est dû à la présence de séquences PEST et de domaines Arg:Arg qui dirigent Mcl-1 vers la protéolyse (Akgul *et al.*, 2000; Moulding *et al.*, 2001). Malgré cette caractéristique, Mcl-1 semble jouer un rôle-clé dans la régulation de l'apoptose du neutrophile puisque les niveaux protéiques de Mcl-1 sont en relation directe avec la survie des neutrophiles. En effet, les niveaux cellulaires de Mcl-1 sont élevés lors de la stimulation des neutrophiles par des agents (GM-CSF, LPS, LTB₄) ou des conditions (hypoxie, sepsie) retardant leur apoptose et sont faibles lors de leur apoptose (Moulding *et al.*, 1998; Leuenroth *et al.*, 2000; Fulop *et al.*, 2002; Harter *et al.*, 2003; Petrin *et al.*, 2005). Il a également été montré que lors de l'activation des neutrophiles, Mcl-1 se fixe au facteur de transcription FOXO (forkhead) reconnu pour son rôle dans la survie et la croissance cellulaire (Crossley, 2003). Ainsi, les propriétés de Mcl-1 font de cette protéine une molécule idéale afin de moduler l'apoptose du neutrophile lors de l'inflammation.

4.5.2.2 Les caspases

Les caspases sont une famille de protéases qui clivent spécifiquement les protéines après les résidus acide aspartique. Les caspases sont divisées en trois groupes : les caspases initiatrices, les caspases exécutrices et les caspases régulatrices. Les caspases initiatrices, en réponse aux signaux pro-apoptotiques, activent les caspases exécutrices qui vont inactiver les protéines essentielles à la survie des cellules. Les caspases régulatrices, quant à elles, ne sont pas spécifiques à l'apoptose et jouent aussi un rôle au niveau de la régulation des fonctions des cellules (Thornberry et Lazebnik, 1998). Les neutrophiles

sont reconnus pour exprimer une variété de caspases, incluant les caspases 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 et 10 (Yamashita *et al.*, 1999; Yabuki *et al.*, 1999; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000). Ces caspases sont, entre autres, impliquées dans l'activation de la protéine kinase C- δ et le clivage de ERK1/2 et p38 MAPK, deux phénomènes observés lors de l'apoptose des neutrophiles (Pongracz *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2001). La présence des IAP (*inhibitor of apoptosis*), inhibiteurs naturels des caspases, a également été mise en évidence dans les neutrophiles stimulés par des agents anti-apoptotiques et suggère que leur modulation permet d'augmenter la survie des neutrophiles (Hasegawa *et al.*, 2003; O'Neill *et al.*, 2004).

4.5.2.3 Les inhibiteurs de l'apoptose

Différentes cytokines, comme l'IL-1 β , l'IL-4, l'IL-6, l'IL-15, l'IFN- γ , le G-CSF et le GM-CSF ainsi que différents produits bactériens comme le LPS prolongent la survie des neutrophiles (Brach *et al.*, 1992; Colotta *et al.*, 1992; Klebanoff *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1996; Girard *et al.*, 1997; Kettritz *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 1998). Ceux-ci inhibent l'apoptose spontanée en modulant l'expression ou l'activité des protéines pro- et anti-apoptotiques. Par exemple, certaines cytokines (GM-CSF, IL-1 β) retardent l'apoptose en réduisant l'activité de la caspase-3, en diminuant l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et/ou en maintenant l'expression de Mcl-1 (Moulding *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 1999; Dibbert *et al.*, 1999). Il a également été montré que le GM-CSF, le CXCL8/IL-8, le PAF (*platelet-activating factor*) et les dinucléotides CpG entraînent la phosphorylation de ERK1/2 et de la protéine Akt, un substrat de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). ERK1/2 et Akt vont alors phosphoryler la protéine pro-apoptotique Bad sur les résidus sérine 112 et 136, respectivement. La phosphorylation de Bad entraîne sa dissociation d'un dimère qu'elle forme normalement avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 afin de les inactiver. Ceci permet donc d'augmenter les effets anti-apoptotiques des protéines de la famille de Bcl-2 (Klein *et al.*, 2000; Khreiss *et al.*, 2004; Jozsef *et al.*, 2004). Les cytokines peuvent également augmenter la sécrétion de facteurs solubles qui amplifieront le signal de survie. L'IL-6, par exemple, retarde l'apoptose des neutrophiles par un mécanisme impliquant la sécrétion de PAF (Biffl *et al.*, 1996). Ainsi,

les cytokines et les produits bactériens peuvent moduler l'apoptose des neutrophiles en affectant l'expression de protéines cytoplasmiques et en augmentant la sécrétion de facteurs anti-apoptotiques.

Le GM-CSF est considéré comme l'activateur-clé des neutrophiles. Cette cytokine agit principalement en sensibilisant les neutrophiles à répondre plus efficacement à un deuxième stimulus. En effet, la pré-stimulation des neutrophiles avec du GM-CSF augmente la phagocytose, la production d'anions superoxydes et la dégranulation (Lopez *et al.*, 1986; Clark, 1988; Nathan, 1989). Le GM-CSF agit également directement sur le neutrophile en augmentant la synthèse et la sécrétion de différentes protéines (dont l'IL-1 et l'IL-1Ra) et en retardant leur apoptose spontanée (McColl *et al.*, 1992; Colotta *et al.*, 1992). Le GM-CSF module les fonctions des neutrophiles et retarde leur apoptose en activant différentes voies de signalisation. Il a été montré que le GM-CSF active la voie de signalisation Jak-STAT en entraînant la phosphorylation sélective de Jak-2, STAT1, STAT3 et STAT5b et la liaison subséquente de ces facteurs de transcription à l'ADN (Brizzi *et al.*, 1996; Al-Shami *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1998a; Sakamoto *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que la kinase Lyn s'associe au récepteur du GM-CSF et que cette association est essentielle pour retarder l'apoptose des neutrophiles (Wei *et al.*, 1996). Le GM-CSF active également la voie de signalisation de PI3K/AKT, activation critique pour l'augmentation des fonctions effectrices des neutrophiles (Al-Shami *et al.*, 1997; Coffey *et al.*, 1998; Al-Shami et Naccache, 1999). L'activation de la voie PI3K/AKT entraîne la modulation de la protéine pro-apoptotique Bad et l'augmentation de la stabilité de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Klein *et al.*, 2000; Epling-Burnette *et al.*, 2001b; Cowburn *et al.*, 2002; Derouet *et al.*, 2004). Le GM-CSF active également la voie de signalisation des MAPK, protéines jouant un rôle important dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire. Il a été montré que le GM-CSF retarde l'apoptose des neutrophiles en augmentant la phosphorylation de p38 MAPK et ERK1/2 (Coffey *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2000).

4.5.2.4 Les inducteurs de l'apoptose

L'apoptose des neutrophiles peut être accélérée par différents agents. Il a été montré récemment que la liaison de TNF- α , de CD178 (FasL) et de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), à des récepteurs de mort associés à la famille du TNF, en l'occurrence le récepteur-1 de TNF (TNF-R1), Fas (CD95) et le récepteur de TRAIL accélère l'apoptose spontanée des neutrophiles (Liles *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1997; Renshaw *et al.*, 2003; Lum *et al.*, 2005). L'effet du TNF- α est toutefois particulier puisque cette cytokine accélère rapidement l'apoptose d'une sous-population de neutrophiles et stimule une voie anti-apoptotique dans les cellules survivantes (Murray *et al.*, 1997). De plus, il a été montré que le TNF- α induit l'apoptose des neutrophiles par deux voies de signalisation distinctes. La première est classique et implique l'activation des caspases alors que la seconde est indépendante des caspases et est induite par les espèces réactives dérivées de l'oxygène libérées par les mitochondries (Maianski *et al.*, 2003). Il a également été montré que le stress oxydatif accélère l'apoptose des neutrophiles (Kasahara *et al.*, 1997; Rollet-Labelle *et al.*, 1998). De plus, comme les neutrophiles produisent des molécules réactives dérivées de l'oxygène lors de leur stimulation, ces molécules peuvent être la source de leur propre mort à la fin du processus inflammatoire. Par exemple, l'éthanol et les rayons ultraviolets induisent une hausse de l'activité oxydative des neutrophiles, ce qui contribue à augmenter leur apoptose (Sweeney *et al.*, 1997; Singhal *et al.*, 1999). Finalement, différentes molécules, comme la clozapine, un agent antipsychotique utilisé dans le traitement de la schizophrénie, et différentes lectines végétales, comme la *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I), peuvent aussi induire l'apoptose des neutrophiles (Bussing *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2000).

La VAA-I est une lectine du gui (*Viscum album*) de la famille de type II des protéines inhibant les ribosomes (*ribosome-inactivating proteins* ou RIP). La molécule VAA-I est composée de deux sous-unités : la chaîne A et la chaîne B. La chaîne A confère à la molécule ses propriétés inhibitrices de la synthèse protéique en inactivant les ribosomes. La chaîne B permet à la VAA-I de se lier aux résidus galactoside exprimés à la membrane des cellules (Olsnes *et al.*, 1982; Endo *et al.*, 1988; Dietrich *et al.*, 1992). Il a été montré

que la VAA-I agit comme un immunomodulateur en activant différents types cellulaires. À faibles concentrations, la VAA-I induit la synthèse protéique, ce qui se traduit par l'augmentation du nombre de cellules NK et de leur activité, par la croissance des cellules progénitrices hématopoïétiques ainsi que par la sécrétion de cytokines (Hajto *et al.*, 1990; Hostanska *et al.*, 1995; Hajto *et al.*, 1997; Hajto *et al.*, 1998; Vehmeyer *et al.*, 1998). Par contre, à des concentrations élevées, la VAA-I inhibe la synthèse protéique et induit l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, tels les lymphocytes, les monocytes et les thymocytes (Hostanska *et al.*, 1996-1997). En Europe, la VAA-I (commercialisée sous le nom d'Iscador) est utilisée comme adjuvant pour le traitement de différents types de cancers (Kovacs *et al.*, 1991; Gorter *et al.*, 1998; Kovacs, 2000).

Notre laboratoire a récemment montré que la VAA-I active la synthèse protéique *de novo* des neutrophiles à faibles concentrations (<100 ng/mL), mais que celle-ci est inhibée à des concentrations plus élevées (>100 ng/mL). Cette inhibition de la synthèse protéique induit l'apoptose des cellules par un mécanisme dépendant des caspases (Savoie *et al.*, 2000). Nous avons également montré que l'induction de l'apoptose par la VAA-I implique la diminution de l'expression de la molécule anti-apoptotique Mcl-1 et la dégradation dépendante des caspases de protéines du cytosquelette, i.e. la paxilline et la vimentine. La VAA-I induit aussi la dépolarisation de la membrane mitochondriale et augmente la production de molécules réactives dérivées de l'oxygène (Lavastre *et al.*, 2002). Finalement, la VAA-I, à faibles concentrations, induit un recrutement relatif des neutrophiles dans le modèle murin de la poche d'air alors qu'elle inhibe complètement le recrutement des neutrophiles induit par le LPS à fortes concentrations (Lavastre *et al.*, 2004). La VAA-I offre donc une stratégie thérapeutique intéressante puisqu'elle permet, selon la concentration utilisée, soit de stimuler les neutrophiles, soit de les éliminer.

4.5.3 La reconnaissance des neutrophiles par les macrophages

Le concept de l'ingestion des neutrophiles par les macrophages n'est pas nouveau. En 1891, Elie Metchnikoff a observé au microscope des macrophages englobant des microphages (ancienne terminologie des neutrophiles) alors que des cellules de Reiter

(macrophages ayant ingérés des neutrophiles) ont été observées durant les années 60 et 70 dans les fluides de patients atteints de différentes formes d'arthrite (cité dans Savill *et al.*, 1989b). Aujourd'hui, il est reconnu que les macrophages phagocytent les neutrophiles apoptotiques, les empêchant de libérer leur contenu histotoxique (Bicknell *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1996; Meszaros *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2001; Brazil *et al.*, 2005). Le macrophage reconnaît le neutrophile apoptotique par différentes molécules, dont le récepteur de vitronectine ($\alpha_v\beta_3$), le récepteur de la thrombospondine (CD36) et le récepteur CD93 (C1qRp) (Savill *et al.*, 1990; Savill *et al.*, 1992; Fadok *et al.*, 1992; Norworthy *et al.*, 2004). De plus, l'ingestion de neutrophiles apoptotiques par les macrophages inhibe la production de médiateurs pro-inflammatoires par ces derniers, ce qui diminue l'inflammation (Meagher *et al.*, 1992; Fadok *et al.*, 1998). Malgré le fait qu'il soit généralement accepté que les neutrophiles apoptotiques n'ayant pas été éliminés par les macrophages sont associés au prolongement du processus inflammatoire (Ward *et al.*, 1999), de récentes recherches semblent indiquer que la persistance de cellules apoptotiques n'est pas nécessairement associée à une réponse inflammatoire ou au développement de maladies auto-immunes. En effet, il a été montré que les macrophages provenant de souris déficientes pour CD14 ou CD93 ne peuvent éliminer efficacement les cellules apoptotiques, mais que la persistance de ces cellules n'est pas associée à une réponse inflammatoire, ni au développement de maladies auto-immunes (Devitt *et al.*, 2004; Norworthy *et al.*, 2004). Ceci indique donc que la persistance de cellules apoptotiques est également associée à un processus anti-inflammatoire.

4.6 Pathologies associées aux neutrophiles

Il existe un grand nombre de maladies reliées à une hyperactivité des neutrophiles, comme le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (ARDS), l'ischémie-réperfusion, la goutte, l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, l'emphysème et la sarcoïdose (Leff et Repine, 1993). En effet, plusieurs fonctions reliées à la destruction des pathogènes, comme la flambée respiratoire générant des radicaux libres et la dégranulation d'enzymes protéolytiques, peuvent endommager autant les tissus de l'hôte que les pathogènes. Les cellules environnantes possèdent généralement des inhibiteurs de protéases et des

systèmes de protection contre les radicaux libres qui permettent de réduire les dommages causés par les neutrophiles (Matzner, 1997).

4.6.1 L'arthrite rhumatoïde

Une variété de leucocytes infiltre massivement l'articulation normalement acellulaire chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Ces leucocytes comprennent des macrophages, des plasmocytes, des lymphocytes T et des neutrophiles. Les lymphocytes T et les macrophages sont considérés comme les cellules responsables de provoquer l'arthrite rhumatoïde. Bien que ces cellules jouent un rôle-clé dans les premiers stades de la maladie, les cellules ayant la capacité d'infliger les dommages les plus importants sont les neutrophiles (Edwards et Hallett, 1997). Il a été montré que les neutrophiles sont nombreux dans le liquide synovial et les tissus des articulations durant les stades précoces de l'arthrite rhumatoïde et durant les exacerbations aiguës de la maladie (Mohr *et al.*, 1984). En effet, le liquide synovial du genou d'un patient atteint d'arthrite peut excéder 30 mL et contenir jusqu'à 5×10^9 neutrophiles (Pillinger et Abramson, 1995). Ces derniers contribueraient directement à la destruction du cartilage par l'action de leurs protéases à sérine (comme l'élastase et la collagénase) et de leur métalloprotéases ainsi que par la production de molécules réactives dérivées de l'oxygène (Opdenakker *et al.*, 1991; Chatham *et al.*, 1993; Larbre *et al.*, 1994; Edwards et Hallett, 1997; Ajasekhar *et al.*, 2004).

La présence, dans le fluide synovial, de quantités élevées de cytokines et chimiokines produites par les neutrophiles et/ou pouvant activer ces derniers (IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO α et IL-15), ainsi qu'une quantité élevée de complexes immuns (formés à partir d'anticorps sécrétés par les plasmocytes) pouvant activer les neutrophiles, suggèrent également une implication de ces cellules dans l'arthrite rhumatoïde (Brennan *et al.*, 1990; Seitz *et al.*, 1991; Endo *et al.*, 1991; Issekutz *et al.*, 1994; van Leeuwen *et al.*, 1995; Koch *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1996; McInnes *et al.*, 1996). En effet, il a été démontré que le CXCL8/IL-8, abondamment produit par les chondrocytes, joue un rôle crucial dans le recrutement et l'activation des neutrophiles

dans les articulations de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, menant ainsi à la destruction du cartilage (Lotz *et al.*, 1992; Recklies et Golds, 1992; Matsukawa *et al.*, 1995; Troughton *et al.*, 1996). Entre autres, le CXCL8/IL-8 augmente l'expression de CD11b/CD18 à la surface de neutrophiles isolés des fluides synoviaux de ces patients (De Gendt *et al.*, 1996). Il a également été montré *in vitro* que la destruction du cartilage par les neutrophiles est augmentée par le TNF- α (Kowanko *et al.*, 1990). Le TNF- α augmente également l'expression de CD54 (ICAM-1) à la surface des cellules endothéliales, molécule capitale pour le recrutement et l'adhésion des leucocytes (Gerritsen *et al.*, 1993; Schwachula *et al.*, 1994; To *et al.*, 1996). L'administration d'anticorps anti-TNF- α chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde permet de réduire les niveaux de cytokines et de chimiokines, ainsi que la quantité de leucocytes dans les articulations montrant ainsi l'importance de cette cytokine dans la pathogénèse de cette maladie (Elliott *et al.*, 1994a; Elliott *et al.*, 1994b; Ohshima *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000). Toutefois, l'injection d'anticorps anti-TNF- α n'altère pas la chimiotaxie et la phagocytose des neutrophiles, ni leur production de molécules réactives dérivées de l'oxygène (den Broeder *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2005). Ceci suggère que le blocage de plusieurs cytokines et chimiokines est nécessaire afin d'éliminer efficacement les neutrophiles des articulations de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Une meilleure compréhension des effets des cytokines présentes dans les fluides sur les fonctions des neutrophiles est donc essentielle.

Plusieurs études démontrent que les neutrophiles jouent un rôle important dans le développement de l'arthrite rhumatoïde et que les fonctions de ces cellules sont modulées dans les articulations des patients. Récemment, l'équipe de Wipke (2001) a démontré que les neutrophiles sont essentiels dans l'initiation et la progression de l'arthrite rhumatoïde dans un modèle murin. En effet, l'élimination des neutrophiles *in vivo* par l'ajout d'anticorps permet aux souris de développer une résistance aux effets inflammatoires d'un sérum leur ayant été injecté, sérum qui provenait de souris ayant développé l'arthrite. De plus, l'élimination des neutrophiles d'une souris ayant développé la maladie permet de réduire la réaction inflammatoire dans les articulations (Wipke et Allen, 2001). Il a également été montré que les neutrophiles isolés de patients atteints d'arthrite

rhumatoïde expriment des marqueurs d'activation, comme CD11b, CD43, CD63 et TNF-R (Lopez *et al.*, 1995). L'incubation *in vitro* des neutrophiles avec le fluide synovial de patients atteints d'arthrite retarde aussi leur apoptose spontanée et l'apoptose induite par des complexes immuns. Ceci suggère que le microenvironnement du fluide synovial joue un rôle au niveau de la persistance des neutrophiles (Ottonello *et al.*, 2002a). Il a également été suggéré que les neutrophiles dans le fluide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde pouvaient activer les lymphocytes T. En effet, des études récentes démontrent que les neutrophiles provenant du fluide synovial de patients atteints d'arthrite, mais non de la circulation sanguine, expriment la molécule de CMH de classe II et CD83. Des expériences de co-culture ont également montré que ces neutrophiles ayant acquis des caractéristiques de cellules dendritiques peuvent activer les lymphocytes T. Ceci suggère que l'activation mutuelle des neutrophiles et des lymphocytes T pourrait contribuer à favoriser l'inflammation locale et, éventuellement, favoriser le processus de destruction des articulations (Cross *et al.*, 2003; Iking-Konert *et al.*, 2005).

4.6.2 Sarcoïdose et autres maladies respiratoires

Il est maintenant reconnu que les neutrophiles sont impliqués dans la pathogénèse de différentes maladies pulmonaires. Cette association remonte à plusieurs années, où il a été noté que les protéases des neutrophiles ont le potentiel d'endommager les voies respiratoires. En effet, des études *in vivo* ont permis de montrer que deux protéases à sérine, l'élastase et la protéinase-3, sécrétées par les neutrophiles, peuvent induire chez les hamsters des changements pathologiques semblables à l'emphysème humain (Snider *et al.*, 1985; Kao *et al.*, 1988). De plus, il a été observé que le recrutement et la séquestration des neutrophiles dans les voies respiratoires entraîne le développement de l'emphysème chez le chien (Guenter *et al.*, 1981). Plus récemment, le rôle des neutrophiles dans le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte, l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive a également été examiné. Les neutrophiles y sont apparus comme des cellules effectrices fondamentales pouvant infliger des dommages importants aux cellules pulmonaires par la libération de protéases et de radicaux libres (Aldridge, 2002; Stockley, 2002; Ennis, 2003).

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle-clé dans la sarcoïdose, plus particulièrement au niveau de l'accumulation de cellules inflammatoires, la formation de granulomes et la fibrogénèse (Muller-Quernheim, 1998). Ces effets sont, en grande partie, médiés par la sécrétion d'agents pro-inflammatoires, comme IL-1, TNF- α , IL-6, IL-15 et GM-CSF (Hunninghake, 1984; Baughman *et al.*, 1990; Steffen *et al.*, 1993; Enthammer *et al.*, 1993; Agostini *et al.*, 1996). Une relation entre le niveau élevé d'IL-1 β , d'IL-6, de GM-CSF, de CXCL8/IL-8 et CCL3/MIP-1 α chez les patients atteints de sarcoïdose et la quantité de neutrophiles dans leurs fluides provenant d'un lavage broncho-alvéolaire a été observée (Girgis *et al.*, 1995; Prior *et al.*, 1996; Capelli *et al.*, 2002). De plus, les patients atteints de sarcoïdose et dont la maladie progresse ont un pourcentage plus élevé de neutrophiles dans leurs voies respiratoires, comparativement aux patients en rémission ou dans un état stable (Drent *et al.*, 1999; Capelli *et al.*, 2002; Ziegenhagen *et al.*, 2003). Des quantités élevées de collagénase, d'élastase et de MMP-8 ont également été retrouvées dans les fluides provenant du lavage broncho-alvéolaire de patients atteints de sarcoïdose. Ces niveaux d'enzymes corréleront directement avec la sévérité de la maladie et le pourcentage de neutrophiles (Mordelet-Dambrine *et al.*, 1988; Jacobs *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent un rôle actif du neutrophile dans la pathogénèse de la sarcoïdose.

4.6.3 Le rôle des neutrophiles dans les réactions antitumorales

Une grande quantité de molécules immunorégulatrices (IL-1, -2, -4, -7, -12, IFN- α/β , G-CSF et TNF- α), libérées par des cellules tumorales génétiquement modifiées pour les sécréter abondamment, induit le recrutement et l'accumulation de granulocytes au site de la tumeur. L'activation de ces granulocytes entraîne le rejet de la tumeur ainsi que l'induction d'une immunité anti-tumorale envers la tumeur parentale non modifiée (Colombo *et al.*, 1992; Musiani *et al.*, 1996; Musiani *et al.*, 1997; Rozera *et al.*, 1999). L'IL-1 β , le TNF- α , les interférons, les défensines, les protéases (cathepsine G et élastase) et les molécules réactives dérivées de l'oxygène, comme l'oxyde nitrique (NO), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide hypochloreux (HOCl) font partie des médiateurs

cytotoxiques impliqués dans l'élimination des tumeurs par les neutrophiles (Dallegrì *et al.*, 1991; Di Carlo *et al.*, 2003). La libération de CXCL-10/IP-10, de CXCL9/MIG et d'IFN- α par les neutrophiles peut également diminuer le phénomène d'angiogénèse, c'est-à-dire la prolifération de nouveaux vaisseaux sanguins qui permettent aux tumeurs de se disséminer dans l'organisme (Benelli *et al.*, 2003). Ces études suggèrent que les neutrophiles jouent un rôle actif dans l'immunosurveillance des tumeurs, comme il a été démontré dans le cas du cancer du foie et du cancer des poumons (Midorikawa *et al.*, 1990; Matsumoto *et al.*, 1991). Ce rôle peu connu des neutrophiles serait donc relié à la variété et à la quantité des cytokines et chimiokines naturellement libérées par les cellules tumorales et le degré de recrutement et d'activation des neutrophiles (Di Carlo *et al.*, 2001).

4.7 Les neutrophiles et les cytokines à chaîne gamma commune

Liu et ses collaborateurs (1994) ont montré que les neutrophiles expriment constitutivement CD132 (Liu *et al.*, 1994). Les neutrophiles sont donc susceptibles de répondre à chacune de ces cytokines. La section qui suit décrit les effets de ces cytokines sur la physiologie des neutrophiles.

4.7.1 Interleukine-2

En plus d'exprimer CD132, il a été montré que les neutrophiles expriment constitutivement CD122. Ils n'expriment toutefois pas l'IL-2R α (Djeu *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Girard *et al.*, 1995; Schumann *et al.*, 1996). Étant donné que les neutrophiles expriment le récepteur d'affinité intermédiaire pour l'IL-2, cette dernière module certaines de leurs fonctions. Cependant, les résultats varient beaucoup d'une étude à l'autre. D'une part, certains groupes affirment que l'IL-2 augmente les fonctions des neutrophiles (chimiotaxie, adhésion, sécrétion de cytokines, phagocytose, production d'anions superoxydes, dégranulation et activité tumorale) (Kowanko et Ferrante, 1987; Stevens et Piazza, 1990; Edwards *et al.*, 1992; Djeu *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1993; Potapnev *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996; Pericle *et al.*, 1996) alors que d'autres équipes

affirment plutôt que l'IL-2 les inhibe (Kowanko et Ferrante, 1987; Fossat *et al.*, 1993). Selon Wei et ses collaborateurs (1994), l'IL-2 favorise la production et la sécrétion de CXCL8/IL-8 par les neutrophiles alors que McDonald et ses collaborateurs (1998) affirment que l'IL-2 ne l'induit pas du tout (Wei *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1998b). Certaines études affirment que l'IL-2 ne module pas directement les fonctions des neutrophiles, mais agirait plutôt sur les fonctions des neutrophiles préalablement stimulés (Kowanko et Ferrante, 1987; Sugiyama *et al.*, 1993; Girard *et al.*, 1995). En effet, il a été montré que l'IL-2 peut potentialiser la synthèse d'ARNm et de protéine induite par le GM-CSF et diminuer l'augmentation de la phagocytose induite par le TNF- α (Moxey-Mims *et al.*, 1991; Girard *et al.*, 1995). De plus, les effets observés de l'IL-2 sur l'apoptose spontanée des neutrophiles sont contradictoires. Une équipe montre que l'IL-2 retarde leur apoptose spontanée (Pericle *et al.*, 1994) alors que deux autres équipes démontrent que cette cytokine n'a aucun effet à ce niveau (Girard *et al.*, 1996; Ottonello *et al.*, 2002b). Toutefois, la variabilité au niveau des conditions expérimentales (concentration cellulaire, source et concentration du sérum dans le milieu de culture) pourrait expliquer, en partie, ces différences.

4.7.2 Interleukine-4

Plusieurs équipes ont rapporté que l'IL-4 est un activateur des fonctions des neutrophiles. En effet, l'IL-4 augmente la phagocytose, la sécrétion de CXCL8/IL-8, l'activité bactéricide et l'activité anti-tumorale des neutrophiles, sans toutefois induire la dégranulation et la flambée oxydative. L'IL-4 peut toutefois potentialiser la flambée oxydative et la dégranulation induite par le fMLP (Boey *et al.*, 1989; Bober *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1997; Reglier-Poupet *et al.*, 1998; Noffz *et al.*, 1998). L'IL-4 augmente aussi la migration des neutrophiles pré-stimulés, en plus d'induire des réarrangements au niveau du cytosquelette (Bober *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1997). Il a également été montré que les neutrophiles expriment la chaîne spécifique du récepteur à l'IL-4, CD124 (IL-4R α) (Girard *et al.*, 1997). Des résultats contradictoires ont été obtenus quant aux effets de l'IL-4 sur l'apoptose spontanée des neutrophiles. Tandis que Brach et ses collaborateurs (1992) n'observe aucun effet, Girard et ses collaborateurs (1997) ont

démonstré que l'IL-4 retarde leur apoptose spontanée de manière concentration-dépendante (Brach *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1997). L'IL-4 peut augmenter la granulopoïèse induite par le G-CSF des cellules de la moelle osseuse et induire la maturation des cellules HL-60 en neutrophiles (Kajitani *et al.*, 1989; Bober *et al.*, 1995). Les neutrophiles, suite à leur stimulation avec un ionophore de calcium, peuvent aussi sécréter de l'IL-4 (Brandt *et al.*, 2000). Ceci suggère que l'IL-4 peut exercer des effets autocrines sur la différenciation, l'activation et la survie des neutrophiles.

L'IL-4 exerce également des effets anti-inflammatoires sur les neutrophiles. En effet, l'IL-4 inhibe le recrutement de neutrophiles *in vivo* (Saleem *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2003). De plus, l'IL-4 inhibe le retard d'apoptose induit par l'IL-1 en stimulant la sécrétion du récepteur soluble de type II de l'IL-1 (sIL-1R II). Ce dernier agit comme un leurre en fixant l'IL-1 et empêche ainsi la cytokine de se fixer au véritable récepteur exprimé par les neutrophiles (Colotta *et al.*, 1993). L'IL-4 augmente la sécrétion de l'IL-1Ra et inhibe l'expression induite par le LPS de CXCL8/IL-8, de TNF- α , d'IL-1 β , de COX-2 et de PGE₂ dans les neutrophiles (Wertheim *et al.*, 1993; Re *et al.*, 1993; Malyak *et al.*, 1994; Marie *et al.*, 1996; Niiro *et al.*, 1997; Nagano *et al.*, 2002; Crepaldi *et al.*, 2002). L'IL-4 supprime également l'expression des monokines CXCL9/MIG et CXCL-10/IP-10 induite par une combinaison d'IFN- γ et de LPS ou d'IFN- γ et de TNF- α (Gasperini *et al.*, 1999). Finalement, l'IL-4, en combinaison avec l'IL-10, diminue l'activité antifongique des neutrophiles contre *Candida albicans*, tout en diminuant la production d'anion superoxydes (Tascini *et al.*, 1996).

4.7.3 Interleukine-7

Il a été rapporté que l'administration d'IL-7 entraîne la mobilisation de cellules progénitrices de la lignée myéloïde de la moelle osseuse vers le sang, la rate, le foie et possiblement d'autres organes périphériques chez la souris (Damia *et al.*, 1992; Grzegorzewski *et al.*, 1994). L'administration d'IL-7 augmente également le nombre de granulocytes immatures dans la rate de la souris (Faltynek *et al.*, 1992). Pourtant, l'IL-7 ne se fixe pas sur les cellules myéloïdes lors d'études de liaison utilisant de l'IL-7

radiomarquée (Park *et al.*, 1990). Ainsi, il est possible de croire que l'IL-7 agit indirectement sur la mobilisation des cellules immatures myéloïdes en activant d'autres types de cellules exprimant l'IL-7R. Les granulocytes matures, et plus spécifiquement les neutrophiles, n'expriment pas la chaîne spécifique du récepteur à l'IL-7, CD127 (IL-7R α) (Armitage *et al.*, 1992; Girard et Beaulieu, 1997). Ainsi, l'IL-7 ne module aucune fonction des neutrophiles (flambée oxydative et phagocytose), en plus de ne pas moduler la synthèse d'ARNm ni l'apoptose spontanée. Il est donc possible de conclure que l'expression de CD132 par les neutrophiles est insuffisante à elle seule pour que l'IL-7 module leurs fonctions (Girard et Beaulieu, 1997).

4.7.4 Interleukine-9

Des résultats contradictoires ont été obtenus quant à l'expression de la chaîne spécifique de l'IL-9 (CD129 - IL-9R α) et aux effets de l'IL-9 sur les fonctions des neutrophiles. L'équipe de Girard (1998) a montré que les neutrophiles n'expriment pas CD129 à leur surface, expliquant ainsi l'incapacité de l'IL-9 d'induire directement ou de potentialiser la production d'anions superoxydes, la phagocytose et la synthèse d'ARNm. De plus, l'IL-9 ne module pas l'apoptose des neutrophiles (Girard *et al.*, 1998). L'équipe de Abdelilah (2001), au contraire, démontre que les neutrophiles de certains donneurs expriment CD129, mais que les neutrophiles de patients asthmatiques expriment fortement cette chaîne de récepteur. La stimulation des neutrophiles de patients asthmatiques entraîne la sécrétion de CXCL8/IL-8, sécrétion pouvant être inhibée par l'ajout d'un anticorps anti-IL-9 (Abdelilah *et al.*, 2001). Étant donné que les éosinophiles sont les principales cellules contaminantes lors de l'isolation des neutrophiles et que ce sont les cellules prédominantes dans les fluides de patients asthmatiques, il est possible de spéculer que ce sont ces cellules qui expriment CD129 et qui sécrètent CXCL8/IL-8 (Bousquet *et al.*, 1990; Girard, 2003). Des études supplémentaires sont donc requises afin d'évaluer avec plus de précision l'expression de CD129 par les neutrophiles et d'évaluer les effets de l'IL-9 sur ces cellules.

4.7.5 Interleukine-15

Les fonctions des neutrophiles sont modulées par l'IL-15 puisque les neutrophiles expriment les trois chaînes de l'IL-15R (Djeu *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Girard *et al.*, 1998; Musso *et al.*, 1998). Il a été montré que cette cytokine induit des changements morphologiques, active la synthèse protéique *de novo* et augmente le processus de phagocytose des neutrophiles (Girard *et al.*, 1996). L'IL-15 augmente également l'activité antifongique des neutrophiles envers *Candida albicans* et les espèces *Aspergillus*, *Fusarium* et *Scedosporium* (Musso *et al.*, 1998; Winn *et al.*, 2005). L'IL-15 induit la sécrétion de CXCL8/IL-8, d'IL-1 β et d'IL-1Ra, en plus d'induire la sécrétion de sIL-1RII, de la forme soluble de la chaîne gp130 et d'IFN- γ lors d'une co-stimulation des neutrophiles avec du LPS, de l'IL-18 et de l'IL-12, respectivement (McDonald *et al.*, 1998b; Musso *et al.*, 1998; Jablonska *et al.*, 2001; Jablonska et Marcinczyk, 2003; Ethuin *et al.*, 2004; Winn *et al.*, 2005). L'IL-15 active la kinase Syk et le facteur de transcription NF- κ B (McDonald *et al.*, 1998b; Rathe et Girard, 2004). Il a été montré que l'IL-15 induit la redistribution d'ICAM-3 et PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) aux uropodes des neutrophiles (Alonso-Lebrero *et al.*, 2000). L'IL-15 augmente aussi l'activité chimiotactique envers le fMLP et le CXCL8/IL-8, mais n'est pas un chimioattractant en soi (Mastroianni *et al.*, 2000). L'IL-15 semble également pouvoir induire la flambée oxydative, mais sous certaines conditions de stimulation seulement (Winn *et al.*, 2005). Il a récemment été montré que l'IL-15 augmente l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la production de NO (Jablonska *et al.*, 2005). L'IL-15 retarde également l'apoptose spontanée des neutrophiles par un mécanisme impliquant la diminution de la protéine anti-apoptotique Bax et la diminution de l'activité de la caspase-3 et de la caspase-8 (Girard *et al.*, 1996; Ottonello *et al.*, 2002a; Ottonello *et al.*, 2002b; Bouchard *et al.*, 2004). Finalement, l'IL-15 augmente les fonctions réduites des neutrophiles, telles l'activité antifongique et la chimiotaxie envers le fMLP, de patients atteints du VIH ou de la borréliose de Lyme, en plus de retarder leur apoptose spontanée (Mastroianni *et al.*, 2000; Jablonska *et al.*, 2003a).

L'IL-15 pourrait également augmenter l'activité antitumorale des neutrophiles *in vivo*. En effet, l'injection d'un mélanome sécrétant de l'IL-15, seule ou en combinaison avec l'IL-12, entraîne un retard de la croissance de la tumeur ou son rejet complet. L'immunohistochimie des tumeurs sécrétant de l'IL-15 ou une combinaison d'IL-15 et d'IL-12 a révélé une augmentation de la quantité de plusieurs types cellulaires, dont majoritairement des cellules NK, des neutrophiles et des macrophages (Di Carlo *et al.*, 2000; Meazza *et al.*, 2000; Di Carlo *et al.*, 2000; Comes *et al.*, 2002). L'injection du mélanome sécrétant de l'IL-15 et de l'IL-12 dans des souris déficientes en cellules NK a démontré que ce sont les neutrophiles et les macrophages qui sont responsables du rejet de la tumeur (Di Carlo *et al.*, 2000).

Certaines études suggèrent que les neutrophiles pourraient sécréter de l'IL-15. Une première étude a démontré que l'inflammation pulmonaire induite par le LPS chez la souris induit un influx rapide de neutrophiles. Il a été montré que ces neutrophiles pulmonaires expriment des quantités élevées d'ARNm d'IL-15 (Ferretti *et al.*, 2003). Une seconde étude a quant à elle montré que les neutrophiles isolés du sang de patients atteints de la borréliose de Lyme sécrètent de l'IL-15 (Jablonska *et al.*, 2003b). Finalement, la stimulation des neutrophiles avec le bacille de Calmette-Guérin, *Mycobacterium bovis*, diminue l'expression du gène de l'IL-15 (Suttman *et al.*, 2003). Ainsi, la stimulation du neutrophile dans certaines conditions pourrait possiblement induire la production d'IL-15 qui exercerait des effets autocrines sur celui-ci. Cette sécrétion de l'IL-15 par les neutrophiles reste toutefois à être confirmée.

4.7.6 Interleukine-21

Les résultats de certaines études suggèrent qu'une interaction *in vivo* serait possible entre l'IL-21 et les neutrophiles. L'équipe de Parrish-Novak (2002) a observé que la surexpression de l'IL-21 chez des souris induit l'accumulation de neutrophiles et de macrophages dans certains tissus (observations non publiées citées dans Parrish-Novak *et al.*, 2002). De plus, l'administration à des souris d'un vecteur qui augmente les niveaux d'IL-21 dans la circulation sanguine entraîne la modification des populations de cellules

du système immunitaire dans le sang et la rate. Entre autres, le pourcentage de cellules CD11b⁺ et Gr-1⁺, deux marqueurs de neutrophiles, est augmenté chez ces souris (Wang *et al.*, 2003). Finalement, l'injection d'un mélanome sécrétant de l'IL-21 entraîne le rejet complet de cette tumeur. L'élimination des granulocytes entraîne un retard dans le rejet de la tumeur, suggérant que ces cellules, activées par l'IL-21, participent activement au rejet de la tumeur (Di Carlo *et al.*, 2004). Malgré cette interaction possible entre cette cytokine et les neutrophiles, aucune étude n'a démontré que l'IL-21 peut affecter directement les fonctions des neutrophiles, ni que ces derniers expriment l'IL-21R α .

Chapitre 2 : Objectifs du projet de recherche

Le but de ce projet de recherche était d'évaluer les effets de l'IL-15 et de l'IL-21 sur les fonctions des neutrophiles. Ce projet de recherche a été élaboré à partir d'observations sur l'interaction connue ou possible entre ces cytokines et les neutrophiles.

Interaction neutrophiles/IL-15

Il avait été montré que l'IL-15 active les fonctions pro-inflammatoires des neutrophiles (phagocytose, sécrétion de cytokines et chimiokines, activité antifongique) (Girard *et al.*, 1996; Musso *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1998b). L'IL-15 retarde également l'apoptose spontanée des neutrophiles, mais les mécanismes impliqués n'ont pas été élucidés (Girard *et al.*, 1996; Mastroianni *et al.*, 2000). L'activation inappropriée des neutrophiles peut entraîner la destruction tissulaire observée chez les patients atteints de différentes maladies inflammatoires, comme l'arthrite rhumatoïde et la sarcoïdose, où des niveaux élevés d'IL-15 sont détectées dans les fluides biologiques (Mordelet-Dambrine *et al.*, 1988; McInnes *et al.*, 1996; Agostini *et al.*, 1996; Edwards et Hallett, 1997). Malheureusement, rien n'était connu sur le potentiel de l'IL-15 d'induire le recrutement des neutrophiles *in vivo*, ni d'augmenter leur potentiel d'adhésion. De plus, aucune stratégie visant à favoriser les réponses des neutrophiles activés par l'IL-15, comme dans le contexte de l'immunité anti-tumorale, ou encore à éliminer ces cellules dans diverses maladies inflammatoires impliquant l'IL-15, n'avait été suggérée. Nous avons préalablement démontré que la VAA-I, selon la concentration utilisée, active ou inhibe la synthèse protéique des neutrophiles, en plus d'accélérer leur apoptose spontanée (Savoie *et al.*, 2000). La VAA-I représente donc un candidat potentiel visant à moduler les réponses des neutrophiles activés par l'IL-15.

Ainsi, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés :

- 1- Évaluer les effets de l'IL-15 sur le recrutement des neutrophiles *in vivo*.
- 2- Évaluer les effets de l'IL-15 sur l'adhésion des neutrophiles, ainsi que sur l'expression des molécules d'adhésion.

- 3- Évaluer les mécanismes impliqués dans le retard d'apoptose des neutrophiles induit par l'IL-15.
- 4- Évaluer si la VAA-I peut, à faibles concentrations, potentialiser les réponses des neutrophiles induites par l'IL-15 et, à l'inverse, les inhiber à des concentrations plus élevées.

Interaction neutrophiles/IL-21

Il avait été montré que CD132 était indispensable à la signalisation intracellulaire induite par l'IL-21 (Asao *et al.*, 2001). Ensuite, l'équipe de Parrish-Novak (2002) a observé que la surexpression de l'IL-21 chez des souris induit l'accumulation de neutrophiles et de macrophages dans certains tissus (observations non publiées citées dans Parrish-Novak *et al.*, 2002). De plus, l'administration à des souris d'un vecteur qui augmente les niveaux d'IL-21 dans la circulation sanguine augmente le pourcentage de cellules CD11b⁺ et Gr-1⁺, deux marqueurs de neutrophiles, dans le sang et la rate (Wang *et al.*, 2003). Finalement, l'injection d'un mélanome sécrétant de l'IL-21 entraîne le rejet complet de cette tumeur. L'élimination des granulocytes entraîne un retard dans le rejet de la tumeur, suggérant que ces cellules, activées par l'IL-21, participent activement au rejet de la tumeur (Di Carlo *et al.*, 2004). Malgré cette interaction possible entre cette cytokine et les neutrophiles, aucune étude n'a démontré que l'IL-21 peut affecter directement les fonctions des neutrophiles, ni que ces derniers expriment l'IL-21R α . Étant donné que les neutrophiles expriment CD132, nous avons envisagé que l'IL-21 pourrait être un agoniste des neutrophiles.

Ainsi, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés :

- 1- Évaluer les effets de l'IL-21 sur le recrutement des neutrophiles *in vivo*.
- 2- Évaluer si les neutrophiles expriment l'IL-21R α et si cette expression est modulée lors de la différenciation des cellules promyélocytes en neutrophiles.
- 3- Évaluer si l'IL-21 module différentes fonctions des neutrophiles et/ou leur apoptose.

Mise en contexte

L'IL-15 et la VAA-1 sont deux molécules possédant des propriétés thérapeutiques intéressantes (Kovacs *et al.*, 1991; Gorter *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2005). L'IL-15 a la capacité d'activer les fonctions des neutrophiles, en plus de retarder leur apoptose spontanée (Girard *et al.*, 1996; McDonald *et al.*, 1998b; Musso *et al.*, 1998). Il a également été suggéré que cette cytokine augmente l'activité antitumorale des neutrophiles *in vivo* (Di Carlo *et al.*, 2003). Des niveaux élevés d'IL-15 sont associés au développement et à la persistance de certaines pathologies, comme l'arthrite rhumatoïde, où le neutrophile est impliqué dans la destruction tissulaire (McInnes *et al.*, 1996; Edwards et Hallett, 1997). Nous avons préalablement démontré que la VAA-1, selon la concentration utilisée, active ou inhibe la synthèse protéique des neutrophiles, en plus d'accélérer leur apoptose spontanée (Savoie *et al.*, 2000; Lavastre *et al.*, 2002). La VAA-1 offre donc une stratégie thérapeutique intéressante visant à favoriser les réponses des neutrophiles, comme dans le contexte de l'immunité anti-tumorale, ou encore à éliminer ces cellules dans diverses maladies inflammatoires. Nous avons donc entrepris cette étude dans le but de mieux comprendre le mode d'action de la VAA-1. De plus, nous voulions vérifier si cette lectine de plante pouvait, à faibles concentrations, potentialiser les réponses des neutrophiles humains induites par l'IL-15 et, à l'inverse, les inhiber à des concentrations plus élevées.

Plus spécifiquement, nous voulions examiner si la VAA-1 peut:

- i) induire des événements biochimiques tels la phosphorylation sur résidus sérine et thréonine dans les neutrophiles humains ;
- ii) moduler la phagocytose à elle seule et/ou moduler celle induite par l'IL-15;
- iii) inhiber le retard d'apoptose et l'augmentation de la synthèse protéique *de novo* induite par l'IL-15.

Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-1

Martin Pelletier¹, Valérie Lavastre¹, Anik Savoie¹, Claude Ratthé¹, Reinhard Salle, Katarina Hostanska² et Denis Girard¹

¹Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, Québec, H9R 106, Canada.

²Department of Internal Medicine, University Hospital Zürich, Zürich, Switzerland.

La lectine de plante *Viscum album* agglutinine-1 (VAA-1) et la cytokine interleukine-15 (IL-15) sont deux molécules avec des propriétés qui présentent un potentiel thérapeutique. Chacune de ces molécules peut moduler la réponse des neutrophiles. Cette étude fut entreprise afin de mieux comprendre le mode d'action de la VAA-1 et de vérifier si cette lectine pouvait moduler les réponses des neutrophiles humains induites par l'IL-15. Nos résultats indiquent que la VAA-1 n'induit pas d'événements biochimiques intracellulaires, telle que la phosphorylation, dans les neutrophiles humains. De plus, la VAA-1 augmente la phagocytose à elle seule, mais ne module pas celle induite par l'IL-15. Nous montrons également que la VAA-1 inhibe le retard d'apoptose induit par l'IL-15, et que ceci corrèle avec une inhibition de la synthèse protéique *de novo*. Finalement, l'IL-15 ne peut rétablir ni atténuer la fragmentation d'une protéine du cytosquelette, la gelsoline, lors de l'apoptose induite par la VAA-1. Nous concluons que la VAA-1 peut être utilisée pour inhiber certaines fonctions des neutrophiles induites par l'IL-15 et que la VAA-1 agit indépendamment des événements de phosphorylation.

Article publié dans *Clinical Immunology* Vol. 101, No. 2, p. 229-236, 2001.
DOI : <http://dx.doi.org/10.1006/clim.2001.5105>

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

Chapitre 3 : Article 1

Contribution des auteurs

J'ai réalisé les expériences concernant les événements de phosphorylation et la synthèse *de novo* en compagnie de la stagiaire du laboratoire, Claude Ratthé. Anik Savoie a réalisé les expériences sur la phagocytose et l'apoptose. Valérie Lavastre a vérifié la fragmentation de la gelsoline par immunobuvardage de type western. Le Dr Saller et le Dr Hostanska, des collaborateurs du Dr Girard, sont responsables de l'isolation et de la purification de la VAA-1. J'ai participé avec le Dr Girard à la rédaction du manuscrit.

Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-1

Chapitre 4 : Article II

L'IL-15 retarde l'apoptose spontanée des neutrophiles, mais les mécanismes impliqués n'ont pas été élucidés (Girard *et al.*, 1996; Mastroianni *et al.*, 2000). L'activation inappropriée des neutrophiles peut entraîner la destruction tissulaire observée chez les patients atteints de différentes maladies inflammatoires, comme l'arthrite rhumatoïde et la sarcoïdose, où des niveaux élevés d'IL-15 sont détectés dans les fluides biologiques (Mordelet-Dambrine *et al.*, 1988; McInnes *et al.*, 1996; Agostini *et al.*, 1996; Edwards et Hallett, 1997). Nous avons émis l'hypothèse que le retard d'apoptose des neutrophiles induit par l'IL-15 pourrait jouer un rôle dans l'inflammation.

Nous avons entrepris cette étude en comparant les voies de signalisation activées par l'IL-15 et par un agoniste bien caractérisé des neutrophiles, le GM-CSF. Il a été démontré que le GM-CSF entraîne la phosphorylation sélective de Jak-2, STAT1, STAT3 et STAT5b (Brizzi *et al.*, 1996; Al-Shami *et al.*, 1997; Al-Shami *et al.*, 1998; Al-Shami et Naccache, 1999). De plus, le GM-CSF retarde l'apoptose des neutrophiles en activant la voie de signalisation des MAPK, plus spécifiquement p38 et ERK.1/2 (Coffer *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2000). Finalement, le retard d'apoptose induit par le GM-CSF corrèle avec la stabilité de la protéine anti-apoptotique Mei-1 (Moulding *et al.*, 1998; Epling-Burnette *et al.*, 2001b). Nous avons donc pour objectif d'examiner les effets de l'IL-15 sur la stabilité de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et l'activation des voies de signalisation Jak-STAT et MAPK.

Plus spécifiquement, nous voulions examiner si :

- i) l'IL-15 empêche la dégradation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 ;
- ii) les tyrosine kinases en général, et plus spécifiquement les kinases ERK.1/2, p38 MAPK et celles de la famille Jak-STAT, sont impliquées dans le retard d'apoptose en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces voies de signalisation ;

- iii) l'IL-15 entraîne la phosphorylation sur des résidus tyrosine des protéines en général et plus spécifiquement de Jak-2, STAT5b, p38 MAPK et ERK1/2.

Résumé français

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-112

Martin Pelletier, Claude Ratthé et Denis Girard

Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, Québec, H9R 1G6, Canada.

L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine pro-inflammatoire qui agit comme un inhibiteur général de l'apoptose et qui possède des propriétés potentiellement thérapeutiques. L'IL-15 est un agoniste connu pour activer les fonctions des neutrophiles humains. Son mode d'action demeure toutefois inconnu. Nous voulions donc élucider les mécanismes impliqués dans le retard d'apoptose induit par l'IL-15. Nos résultats indiquent que l'IL-15 induit des événements de phosphorylation sur les résidus tyrosine et prévient la perte d'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1. L'utilisation d'inhibiteurs de différentes voies de signalisation nous a permis d'observer que les kinases Jak-2, Jak-3, p38MAPK et ERKI/2, et non les protéines G, sont impliquées dans le retard d'apoptose induit par l'IL-15. De plus, nous démontrons que l'IL-15 active Jak-2, p38MAPK et ERKI/2, mais, contrairement au GM-CSF, n'active pas STAT-5 α . Nous concluons que l'IL-15 retarde l'apoptose des neutrophiles par différentes voies de signalisation impliquant Mcl-1 et différentes kinases. De plus, contrairement au GM-CSF, l'IL-15 n'active pas la voie de signalisation Jak-2/STAT-5, une voie de signalisation importante des neutrophiles.

Article publié dans *FEBS Letters* Vol. 532, No. 2, p. 164-170, 2002

DOI : [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03668-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03668-2)

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

Contributions des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article. Les expériences sur l'apoptose avec les différents inhibiteurs des voies de signalisation ont été réalisées en compagnie de la stagiaire du laboratoire, Claude Ratthé. J'ai participé à la rédaction du manuscrit avec le Dr Girard.

Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mei-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2

Chapitre 5 : Article III

Le recrutement des neutrophiles et leur transmigration à travers l'épithélium pulmonaire pour atteindre les voies respiratoires sont des étapes importantes dans le processus inflammatoire. L'activation des neutrophiles par différentes cytokines et chimiokines entraîne, entre autre, l'augmentation de l'expression de différentes intégrines et de leurs ligands à la surface des neutrophiles et des cellules épithéliales, ainsi que l'adhésion entre les deux types cellulaires (Doerschuk, 2001). Nous avons préalablement démontré que le retard d'apoptose des neutrophiles induit par l'IL-15 pourrait jouer un rôle dans l'inflammation (Girard *et al.*, 1996; Pelletier *et al.*, 2002b). Sachant que des niveaux élevés d'IL-15 ont été détectés dans les voies respiratoires de patients atteints de différentes maladies pulmonaires, comme la sarcoïdose et la tuberculose, et que la quantité de neutrophiles dans les voies respiratoires corrèle avec la sévérité de ces maladies, nous croyons que l'IL-15 pourrait également influencer le sort des neutrophiles en attirant ceux-ci au site inflammatoire et en augmentant leur adhésion aux cellules environnantes (Agostini *et al.*, 1996; Drent *et al.*, 1999; Zissel *et al.*, 2000).

Nous avons décidé d'évaluer le recrutement de neutrophiles *in vivo* en utilisant le modèle murin de la poche d'air. En effet, ce modèle permet à la fois l'évaluation des différentes populations recrutées par un agent particulier et la détection de la production locale d'agents pro-inflammatoires (Dawson *et al.*, 1991). Les expériences d'adhésion ont été effectuées à l'aide de cellules épithéliales pulmonaires A549, modèle utilisé par plusieurs équipes pour des études d'adhésion (Kuo *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Pelletier *et al.*, 2002a). Nous croyons que l'administration d'IL-15 dans le modèle murin de la poche d'air devrait induire le recrutement de neutrophiles et augmenter la production locale d'agents pro-inflammatoires. De plus, l'IL-15 devrait augmenter l'expression d'intégrines à la surface des neutrophiles et de leurs ligands respectifs à la surface des cellules A549, induisant ainsi l'adhésion des neutrophiles à ces cellules.

Plus spécifiquement, nous voulions examiner si :

- i) l'IL-15 augmente l'expression des intégrines CD11a, CD11b, CD11c et CD18 à la surface des neutrophiles ;
- ii) l'IL-15 augmente l'expression des molécules d'adhésion CD50, CD54 et CD106 à la surface des cellules épithéliales pulmonaires A549 ;
- iii) les cellules A549 expriment les trois chaînes de l'IL-15R ;
- iv) l'IL-15 augmente l'adhésion des neutrophiles aux cellules A549;
- v) l'IL-15 augmente le recrutement des neutrophiles dans le modèle inflammatoire murin de la poche d'air;
- vi) l'IL-15 augmente la production locale de deux agents pro-inflammatoires: l'IL-6 et le CXCL2/MIP-2.

Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils *in vivo*

Martin Pelletier et Denis Girard

Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, Québec, H9R 1G6, Canada.

Des niveaux élevés d'interleukine-15 (IL-15), un agoniste des neutrophiles, ont été associés à différentes maladies pulmonaires. L'adhésion des neutrophiles aux cellules pulmonaires est un événement-clé dans le développement de l'inflammation. À ce jour, aucune étude n'a montrée que l'IL-15 module l'expression de molécules d'adhésion à la surface des neutrophiles, ni que l'IL-15 est impliquée dans l'adhésion des neutrophiles aux cellules pulmonaires. De plus, aucune étude n'a clairement démontré que l'IL-15 peut induire un recrutement de neutrophiles *in vivo*. Nous avons donc élaboré cette étude dans le but d'élucider ces points. Les neutrophiles ont été stimulés avec de l'IL-15 et l'expression à la surface des intégrines CD11a, CD11b, CD11c et CD18 a été évaluée par cytométrie en flux. De plus, l'expression extracellulaire des molécules d'adhésion CD50, CD54 et CD106 a été évaluée sur la lignée épithéliale pulmonaire A549, lignée qui a également été utilisée dans les études d'adhésion. Le modèle murin de la poche d'air a été utilisé afin d'évaluer le potentiel de l'IL-15 à induire le recrutement des neutrophiles *in vivo*. Nous montrons que l'IL-15 augmente l'expression de CD11b et CD18 à la surface des neutrophiles, en plus d'augmenter l'expression de CD54 à la surface des cellules A549. De plus, nous montrons que les cellules A549 expriment les trois chaînes du récepteur de l'IL-15. La stimulation des neutrophiles ou des cellules A549 avec l'IL-15 augmente également l'adhésion des neutrophiles à ces cellules. Finalement, l'IL-15 induit un recrutement de neutrophiles *in vivo*, en plus d'augmenter les concentrations

d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2. Nous concluons que l'IL-15 pourrait participer au développement à la persistance de l'inflammation dans les maladies respiratoires en attirant les neutrophiles, en modulant l'expression de molécules d'adhésion et en augmentant leur adhésion aux cellules pulmonaires.

Article publié dans *Clinical and Experimental Immunology* Vol. 141, No.2, p. 315-325, 2005.

doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02861.x

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

Contributions des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article. J'ai entièrement rédigé le manuscrit, avant de le remettre au Dr Girard, qui l'a lu, corrigé et soumis au journal.

Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo

Chapitre 6 : Article IV

Mise en contexte

L'IL-21 et son récepteur spécifique, l'IL-21R α , ont été découverts par les équipes de Parrish-Novak et d'Ozaki en 2000 (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Ozaki *et al.*, 2000). Lors de la caractérisation de l'IL-21, il a été suggéré que l'IL-21 possède une certaine homologie avec l'IL-15 (Parrish-Novak *et al.*, 2000). Un an plus tard, Asao et ses collaborateurs (2001) ont montré que CD132 était indispensable à la signalisation intracellulaire induite par l'IL-21 (Asao *et al.*, 2001). Certaines études récentes suggèrent qu'une interaction *in vivo* serait possible entre l'IL-21 et les neutrophiles (Parrish-Novak *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Di Carlo *et al.*, 2004). Étant donné que les neutrophiles expriment CD132 et que les fonctions des neutrophiles sont modulées par l'IL-15 (Liu *et al.*, 1994; Girard *et al.*, 1996), nous avons envisagé que l'IL-21 pourrait également être un agoniste des neutrophiles. Nous voulions donc vérifier si les neutrophiles humains expriment l'IL-21R α et si l'IL-21 peut directement moduler leurs fonctions. Suite à une entente, le Dr. Donald C. Foster de ZymoGenetics (Seattle, WA) nous a fourni l'IL-21 recombinante humaine afin d'entreprendre nos études *in vitro* sur les neutrophiles humains. Nous voulions également vérifier si l'IL-21 peut induire une réponse inflammatoire *in vivo* en recrutant des neutrophiles dans la poche d'air.

Plus spécifiquement, nous voulions examiner si

- i) l'IL-21 induit le recrutement transitoire ou soutenue de neutrophiles dans le modèle murin de la poche d'air ;
- ii) les neutrophiles expriment l'IL-21R α et si cette expression est modulée lors de la différenciation des cellules promyélocytes en neutrophiles ;
- iii) l'IL-21 module différentes fonctions des neutrophiles et/ou leur apoptose.

Le recrutement inattendu à la fois de neutrophiles et de monocytes/macrophages dans la poche d'air et l'absence de modulation des fonctions des neutrophiles par l'IL-21 (dont la chimiotaxie) nous a permis d'envisager que les monocytes/macrophages puissent être

impliqués dans le recrutement des neutrophiles en sécrétant certaines chimiokines. De plus, l'expression de l'IL-21R α par les cellules HL-60, qui disparaît lors de leur différenciation en neutrophile, nous a permis d'envisager que l'IL-21 puisse jouer un rôle dans la prolifération ou la différenciation des pro-myélocytes.

Plus spécifiquement, nous voulions ensuite vérifier si :

- iv) l'IL-21 augmente, dans la poche d'air, la production locale d'agents pro-inflammatoires impliqués dans l'activation et/ou le recrutement des neutrophiles et des monocytes/macrophages : la cytokine IL-6 et les chimiokines CCL5/RANTES, CCL3/MIP-3 α et CXCL2/MIP2 ;
- v) l'IL-21 entraîne la phosphorylation de ERK1/2 chez les HL-60, une voie de signalisation importante lors de leur différenciation en granulocyte et en monocyte/macrophage (Miranda *et al.*, 2002) ;
- vi) l'IL-21 joue un rôle dans la prolifération et/ou la différenciation des cellules HL-60 ;
- vii) les monocytes et les macrophages expriment l'IL-21R α et si cette expression est modulée lors de la différenciation des cellules HL-60 vers un phénotype de monocyte et de macrophage ;
- viii) l'IL-21 augmente la sécrétion du puissant chimioattractant des neutrophiles CXCL8/IL-8 par les monocytes et les macrophages.

Résumé français

***In vivo* and *in vitro* roles of IL-21 in inflammation**

Martin Pelletier, Amélie Bouchard et Denis Girard

Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, Québec, H9R 1G6, Canada.

L'interleukine-21 (IL-21) est une cytokine qui induit ses effets biologiques suite à liaison à l'IL-21R, composé d'une chaîne spécifique, IL-21R α , et de la chaîne commune γ c (CD132). Des études récentes suggèrent que l'IL-21 possède des propriétés pro-inflammatoires. Toutefois, aucune étude n'a clairement démontré que l'IL-21 pourrait induire l'inflammation *in vivo*. De plus, l'interaction entre les neutrophiles et l'IL-21 n'a jamais été examinée, malgré le fait que ces cellules expriment CD132 et que leurs fonctions sont modulées par d'autres cytokines utilisant le récepteur CD132. L'utilisation du modèle murin de la poche d'air nous a permis de montrer que l'IL-21 induit un processus inflammatoire *in vivo*, caractérisée par le recrutement de neutrophiles et de monocytes/macrophages. Contrairement au LPS, l'IL-21 n'augmente pas la concentration locale des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires IL-6, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-3 α et CXCL2/MIP2. Nous démontrons que les cellules pro-myélocytes HL-60 expriment l'IL-21R α , qui disparaît lors de leur différenciation en neutrophile, et que la chaîne IL-21R α n'est pas exprimée à la surface des neutrophiles. De pair avec cette observation, l'IL-21 induit la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HL-60, mais pas dans les neutrophiles. Afin d'éliminer la possibilité que l'IL-21 pourrait activer les neutrophiles en absence de l'IL-21R α , nous démontrons que l'IL-21 ne module aucune fonction étudiée des neutrophiles (production de radicaux libres, phagocytose, chimiotaxie ainsi que la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires) et n'affecte pas leur apoptose spontanée. La phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules

HL-60 pourrait suggérer que l'IL-21 joue un rôle dans la prolifération ou dans la différenciation de ces cellules. Toutefois, nos résultats montrent que ce n'est pas le cas pour les cellules HL-60. Les monocytes et les macrophages expriment quant à eux l'IL-21R α et les macrophages stimulés avec l'IL-21 sécrètent du CXCL8/IL-8, un puissant chimioattractant des neutrophiles. Nous concluons que l'IL-21 est une cytokine pro-inflammatoire, mais qu'elle n'est pas un agoniste direct des neutrophiles. Nous proposons que l'IL-21 pourrait recruter les neutrophiles indirectement par un mécanisme indépendant de la production d'IL-6, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-3 α et CXCL2/MIP2 et qui impliquerait possiblement les monocytes/macrophages.

Article publié dans *Journal of Immunology* Vol. 173, No. 12, p. 7521-7530, 2004.

Copyright 2004. *The American Association of Immunologists, Inc.*

Contributions des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article. Amélie Bouchard a participé aux expériences impliquant le modèle murin de la poche d'air et la modulation des fonctions des neutrophiles *in vitro*. J'ai rédigé entièrement le manuscrit qui a été lu par la co-auteure et le Dr Girard qui l'a ensuite corrigé puis soumis au journal.

***In vivo and in vitro* roles of IL-21 in inflammation**

In Vivo and In Vitro Roles of IL-21 in Inflammation¹

Martin Pelletier, Amélie Bouchard, and Denis Girard²

IL-21 is a cytokine known to mediate its biological action via the IL-21R, composed of a specific chain, IL-21R α , and the common γ -chain (CD132). Recent data suggest that IL-21 possesses proinflammatory properties. However, there is no clear evidence that IL-21 induces inflammation *in vivo* and, curiously, the interaction between IL-21 and neutrophils has never been investigated, despite the fact that these cells express CD132 and respond to other CD132-dependent cytokines involved in inflammatory disorders. Using the murine air pouch model, we found that IL-21 induced inflammation *in vivo*, based on recruitment of neutrophil and monocyte populations. In contrast to LPS, administration of IL-21 into the air pouch did not significantly increase the concentration of IL-6, CCL5, CCL3, and CXCL2. We demonstrated that HL-60 cells expressed IL-21R α , which is down-regulated during their differentiation toward neutrophils, and that IL-21R α is not detected in neutrophils. Concomitant with this, IL-21 induced Erk-1/2 phosphorylation in HL-60 cells, but not in neutrophils. To eliminate the possibility that IL-21 could activate neutrophils even in the absence of IL-21R α , we demonstrated that IL-21 did not modulate several neutrophil functions. IL-21-induced Erk-1/2 phosphorylation was not associated with proliferation or differentiation of HL-60 toward neutrophils, monocytes, or macrophages. IL-21R α was detected in human monocytes and monocyte-derived macrophages, but IL-21 increased CXCL8 production only in monocyte-derived macrophages. We conclude that IL-21 is a proinflammatory cytokine, but not a neutrophil agonist. We propose that IL-21 attracts neutrophils indirectly *in vivo* via a mechanism independent of IL-6, CCL3, CCL5, and CXCL2 production. *The Journal of Immunology*, 2004, 173: 7521–7530.

Interleukin-21 is a recently identified cytokine known to mediate its biological activity through the IL-21R composed of a specific chain, IL-21R α , and the common γ -chain (γ_c)³ (CD132) shared by receptors to IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, and IL-15. IL-21R α is a member of the type I cytokine receptor superfamily that has the highest amino acid sequence similarity to IL-2/15R β (CD122) and IL-4R α (CD124). Northern blot analysis revealed IL-21R α transcripts mainly in lymphoid tissues (1), and also in PHA-activated PBMCs (2). Western blot analysis confirmed that IL-21R α is expressed in resting lymphoid cells, activated PBMCs, and in some cell lines of T, B, and NK origins. The γ_c has also been demonstrated to be an indispensable subunit of the functional IL-21R complex (3, 4).

IL-21 has close structural similarities to IL-2, IL-4, and IL-15, and is known to regulate proliferation of mature T and B cells in response to activating stimuli. IL-21 mediates NK cell expansion from bone marrow (1), and inhibits dendritic cell activation and maturation (5). It was also found to regulate Ig production from B cells (6) and to prevent Ag-induced IgE production of IL-4-stimulated B cells (7). IL-21 was also shown to be a growth and survival factor for human myeloma cells (8) and to display antitumor

activity (9). Recently, Wang et al. (10) demonstrated that IL-21 possesses antitumor activity *in vivo*, mediated by NK cells, suggesting that this cytokine may have therapeutic potential.

As with other CD132-dependent cytokines, IL-21 was found to activate the Jak/STAT pathway. In particular, IL-21 activates Jak-1 and 3 and STAT1, STAT3, STAT5 in different human T cell and B cell lines and in YT NK cells (2–4). In addition to the Jak/STAT pathway, IL-21 was found to activate the MAPK pathway, because it induces phosphorylation of Erk1/2 (p44/42 MAPK), at least in myeloma cells (8).

An increasing number of studies have indicated that human neutrophils can be activated by several CD132-dependent cytokines and to express several, but not all, of the corresponding receptor components (see Ref. 11 for a review). Interestingly, human neutrophils were found to express γ_c (CD132; Ref. 12), IL-2/15R β (CD122; Ref. 13), IL-4R α (CD124; Ref. 14), and IL-15R α (15) on their surface, but not IL-2R α (CD25; Ref. 13), IL-7R α (CD127; Ref. 16), and IL-9R α (15). Neutrophil expression of IL-21R α is not yet known.

Some data suggest that IL-21 is a proinflammatory cytokine. Mice overexpressing IL-21 have shown inflammatory infiltrates in different tissues consisting of macrophages and neutrophils (17). Furthermore, administration of IL-21 plasmid DNA into mice producing high levels of circulating IL-21 *in vivo* resulted in altered populations of immune cells in the spleen and in peripheral blood (10). Interestingly, the percentages of CD11b and Gr-1 stained cells were increased in IL-21-expressing mice (10). TS/A murine mammary adenocarcinoma cells genetically modified to secrete IL-21 (TS/A-IL-21) and develop small tumors were rejected when injected in syngeneic mice (18). Interestingly, 5 days after injection, TS/A-IL-21 tumors showed infiltrating cells, including granulocytes and macrophages.

The above observations prompted us to study potential proinflammatory effects of IL-21 *in vivo* as well as to investigate the interaction of IL-21 with human neutrophils and PBMC. Using the murine air pouch model, we found that IL-21 induced an accumulation of

Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, Canada

Received for publication July 8, 2004. Accepted for publication September 21, 2004.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This study was partly supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-89534) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). M.P. holds a PhD CIHR award, A.B. holds a M.Sc. FRSQ award, and D.G. is a Scholar from FRSQ.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Boulevard Hymus, Pointe-Claire, Canada, H9R 1G6. E-mail address: denis.girard@inrs-iaf.quebec.ca

³ Abbreviations used in this paper: γ_c , common γ -chain; rh, recombinant human; PI, propidium iodide; NBT, nitro blue tetrazolium; Vit D3, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; SRBC, sheep RBC.

neutrophil and mononuclear cells. In vitro studies indicated that IL-21 had no direct effect on several neutrophil functions, but activated immature promyelocytic HL-60 cells based on phosphorylation of Erk-1/2. Interestingly, we found that neutrophils do not express IL-21R α , whereas this component receptor was expressed in HL-60 cells but was down-regulated following maturation toward a neutrophil-like phenotype, as induced by DMSO. IL-21 did not promote cell differentiation of HL-60 cells toward neutrophils, monocytes, or macrophages. However, we found that IL-21 induced monocyte-derived macrophages to secrete CXCL8, a potent neutrophil chemoattractant, suggesting that macrophages may play a role in the recruitment of neutrophils in vivo.

Materials and Methods

Chemicals, agonists, and Abs

Recombinant human (rh) IL-21 was kindly provided by D. C. Foster from ZymoGenetics (Seattle, WA). Recombinant murine IL-21 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). rhGM-CSF and rhIL-15 were purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ). The monoclonal anti-actin clone AC-40 from mouse ascites fluid (mouse IgG2a), the monoclonal anti-Bcl-2 clone Bcl-2-100 from mouse ascites fluid (mouse IgG1), the monoclonal anti-human CD14 clone UCHM-1 FITC conjugate (mouse IgG2a), and the monoclonal anti-human CD11b clone 44 (mouse IgG1) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The monoclonal anti-human IL-21R clone 152504 (mouse IgG1) was from R&D Systems. The FITC-rat anti-mouse F4/80 Ag (rat IgG2b), the FITC-rat anti-mouse neutrophil clone 7/4 (rat IgG2a), and the FITC-rat IgG2a negative control were from Serotec (Raleigh, NC). The FITC-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada). FITC-Annexin V was purchased from BioSource International (Camarillo, CA) and FITC-mouse anti-human CD16 mAb was purchased from BD Pharmingen (Mississauga, Ontario, Canada). LPS, propidium iodide (PI), nitro blue tetrazolium (NBT), PHA-P, purified human IgG, and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (Vit D₃), PMA, and fMLP were purchased from Sigma-Aldrich.

Air pouch experiments

CD1 mice (6- to 8-wk-old) were obtained from Charles River Laboratories (St. Constant, Canada). The mice (≥ 5 /group) were anesthetized with isoflurane and sterilized air (3 ml filtered through a 0.2- μ m Millipore filter; Billerica, MA) was injected s.c. in the back using a 26-gauge needle to make an air pouch on days 0 and 3. On day 6, 1 ml of IL-21, LPS (positive control), or the diluent (PBS) was injected into the air pouches of mice 3, 6, 9, or 24 h before the mice were killed by CO₂ asphyxiation (19). The air pouches were washed once with 1 ml and then twice with 2 ml of HBSS containing 10 mM EDTA, and the exudates were centrifuged at 100 \times g for 10 min at room temperature. Supernatants were collected and stored at -20°C for further analysis. The cells were resuspended in 1 ml of HBSS-EDTA and counted. The cells (2×10^5) were centrifuged, spread onto microscope slides, and stained with Hema-Stain to allow quantification of granulocytic and mononuclear populations. To further characterize the leukocyte subpopulations, the cells were suspended in PBS containing 5 μ g/ml human IgG for 30 min at 4°C to block FcRs and then stained for 30 min at 4°C with purified rat anti-mouse 7/4 mAb directed against murine neutrophils or rat anti-mouse F4/80 Ag Ab directed against murine monocyte/macrophages. Analysis was performed with a FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA).

Detection of murine IL-6, CCL3, CCL5, and CXCL2

Fluids were harvested from air pouches after 3 and 6 h of treatment with buffer, LPS (1 μ g/ml), or IL-21 (100 ng/ml). IL-6, CCL3, CCL5, and CXCL2 were quantified using the following commercially available ELISA kits according to the manufacturer's recommendations: murine IL-6 (sensitivity of <3 pg/ml; BioSource International), murine CCL3, CCL5, and CXCL2 (sensitivity of <2, <1.5, and <1.5 pg/ml, respectively; R&D Systems). All samples were tested at least in duplicate.

Human neutrophil and PBMC isolation, monocytes, and monocyte-derived macrophages

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by centrifugation over Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada) as previously described (19, 20). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institu-

tionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion, and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema-Stain staining kit. Human PBMC were harvested during neutrophil isolation. PBMCs were also incubated in RPMI 1640-10% autologous serum for 2 h at 37°C in plastic dishes and adherent cells were identified as monocytes, based on positive α -naphthyl acetate esterase tests (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). Monocytes were further incubated for 7 days in RPMI 1640-10% FCS supplemented with 2 ng/ml GM-CSF to obtain monocyte-derived macrophages (21).

HL-60 cell differentiation

HL-60 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were treated with 1.25% (v/v) DMSO or with 100 nM 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ for 6 days for differentiation toward neutrophil-like or monocyte-like cells, respectively, or with 10 nM PMA for 3 days for differentiation toward macrophage-like cells. Differentiation was evaluated by morphology, by cell cycle analysis using PI and by the NBT assay (22). Cell surface expression of CD11b (2 μ l/tube) and CD14 (2 μ l/tube) were performed by flow cytometric analysis (10,000 events) using a FACScan (BD Biosciences).

Cell cycle analysis using PI

Cells were harvested and washed twice with PBS. Cells were then fixed in cold 70% ethanol for at least 30 min at 4°C. Cells were washed twice with PBS and treated with 100 μ g/ml RNase. PI (50 μ g/ml) was added and cells were analyzed by flow cytometry.

Immunoblotting

Cells were lysed in 2 \times Laemmli's sample buffer and aliquots corresponding to 0.5×10^6 cells (from 0.5 to 2×10^6 cells for neutrophils) were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred from gel to polyvinylidene difluoride membranes. Nonspecific sites were blocked with 5% nonfat dry milk (Carnation, Don Mills, Ontario, Canada) in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween 20) for 1 h at room temperature. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated overnight at 4°C with mouse anti-IL-21R α at 1 μ g/ml in TBS-Tween. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-mouse HRP secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1/20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk, followed by washes. Membranes were revealed with ECL. Membranes were stripped with agitation for 30 min at 65°C with stripping buffer (100 mM 2-ME, 2% SDS, 62.5 mM Tris, pH 6.7) and washed extensively with TBS-Tween. Membranes were blocked with either TBS-Tween + 2% BSA (anti-actin) or TBS-Tween + 5% nonfat dry milk (anti-Bcl-2) for 1 h at room temperature. Membranes were then probed overnight at 4°C with mouse anti-actin (3 μ g/ml) in TBS-Tween + 1% BSA or mouse anti-Bcl-2 (1/1000) in TBS-Tween. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-mouse HRP secondary Ab at 1/15,000 in TBS-Tween + 2% BSA (anti-actin) or 1/15,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk (anti-Bcl-2) followed by washes. Membranes were revealed with ECL. In other experiments, immunoblotting was performed with the same Ab. Actin and/or Bcl-2 expression was monitored in parallel using specific Abs.

Assessment of neutrophil apoptosis by cytology, CD16 expression, and annexin V

Freshly isolated human neutrophils (100 μ l of a 10×10^6 cells/ml suspension in RPMI 1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 24 h in the presence or absence of increasing concentrations of IL-21, and apoptosis was evaluated by cytology as previously described (19). The results were expressed as the percentage of neutrophils in apoptosis.

CD16 expression and annexin V were used to confirm the inability of IL-21 to modulate the neutrophil apoptotic rate. After 24 h of incubation in the presence or absence of IL-21, the cells were suspended at concentrations of 1.5×10^6 /ml, washed, and preincubated for 30 min at 4°C (light protected) with 20% autologous serum to prevent nonspecific binding via FcRs. The cells were then washed and incubated with 2 μ l of the FITC-mouse anti-human CD16 mAb for 30 min at 4°C (light protected) or with 2 μ l of FITC-Annexin V for 15 min at room temperature (light protected) before FACS analysis. Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (BD Biosciences).

O_2^- production

O_2^- production was performed by colorimetric assay (reduction of cytochrome *c*), as previously published (20). For the priming experiments, cells were incubated for 30 min with IL-21 or 65 ng/ml GM-CSF (positive control) as above, followed by a 5-min incubation with 10^{-7} M fMLP. The absorbance of cytochrome *c* was monitored at 550 nm and the number of O_2^- anions produced was calculated by the difference between corresponding wells with or without O_2^- dismutase using an extinction coefficient of 21.1.

Phagocytosis of sheep erythrocytes

Sheep RBC (SRBC) were opsonized with a final 1/200 dilution of rabbit IgG anti-SRBCs Ab (Sigma-Aldrich) followed by incubation for 45 min at 37°C as previously described (19). Neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI 1640) pretreated 30 min with buffer or IL-21, were incubated with 50×10^6 opsonized SRBCs for 45 min as above. The pollutant toxaphene was used a positive control in this assay (23). The samples were centrifuged at $200 \times g$ at 4°C for 10 min. Supernatants were discarded and, to eliminate noningested SRBCs, osmotic shock was performed on the pellets by treating them with 300 μ l of H₂O for 20 s followed immediately by the addition of 4.5 ml of ice-cold PBS (1 \times). The samples were washed twice with ice-cold PBS and the final pellets were suspended to a final concentration of 10×10^6 cells/ml. Duplicate cytocentrifuged preparations were prepared in aliquots of ~200 μ l and processed essentially as previously documented (19, 21). Phagocytosis was measured as percentage of neutrophils ingesting at least one opsonized SRBC.

Chemotaxis

In vitro chemotaxis was performed in a 48-well Microchemotaxis chamber (NeuroProbe, Gaithersburg, MD) using a 3- μ m polycarbonate membrane filter as previously described (24, 25). CXCL8 was used as a positive control (26).

Production of human CXCL8 and IL-1 β

Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 /ml in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS) were incubated with buffer, GM-CSF (65 ng/ml), or increasing concentrations of IL-21 (100, 250, or 500 ng/ml) for 24 h. The concentration of CXCL8 and IL-1 β released into the external milieu were quantified by commercial ELISA kits (BioSource International; sensitivity of <5 and <1 pg/ml, respectively) according to the manufacturer's instructions. All samples were tested at least in duplicate.

Results

IL-21 induces an inflammatory response in vivo

We decided to use the murine air pouch model to evaluate the potential proinflammatory effect of IL-21 in vivo. Increasing concentrations of murine IL-21 were injected into the air pouch and the number of infiltrated cells was quantified after 6 h, an optimal condition in this model (27). As a positive control, we used LPS-induced pouches, a condition known to attract several millions of cells after a few hours, among which >85% of cells are neutrophils (19, 28, 29). As illustrated in Fig. 1A, IL-21 induces cell accumulation into the air pouch. The maximum number of cells attracted by IL-21 ($2.4 \pm 0.5 \times 10^6$ cells/pouch) was observed at a concentration of 100 ng/ml IL-21. As expected, LPS caused a significant accumulation of cells with an average number of $6.6 \pm 0.9 \times 10^6$ cells/pouch. Cytocentrifuged preparations were performed to characterize the leukocyte subpopulations migrating into the air pouch (Fig. 1B). When compared with LPS, IL-21 attracted a higher proportion of mononuclear cells in addition to neutrophils. We identified ~12% of mononuclear cells in response to LPS, whereas this number increases to ~35% in response to IL-21. The mononuclear cells observed by cytology were mainly of the monocytic lineage, as confirmed by the α -naphthyl acetate esterase enzymatic test (Fig. 1B) and by the binding of the F4/80 Ab by flow cytometry (Fig. 1C).

Knowing that IL-21 attracted a significant number of cells other than neutrophils, we performed kinetic experiments to answer

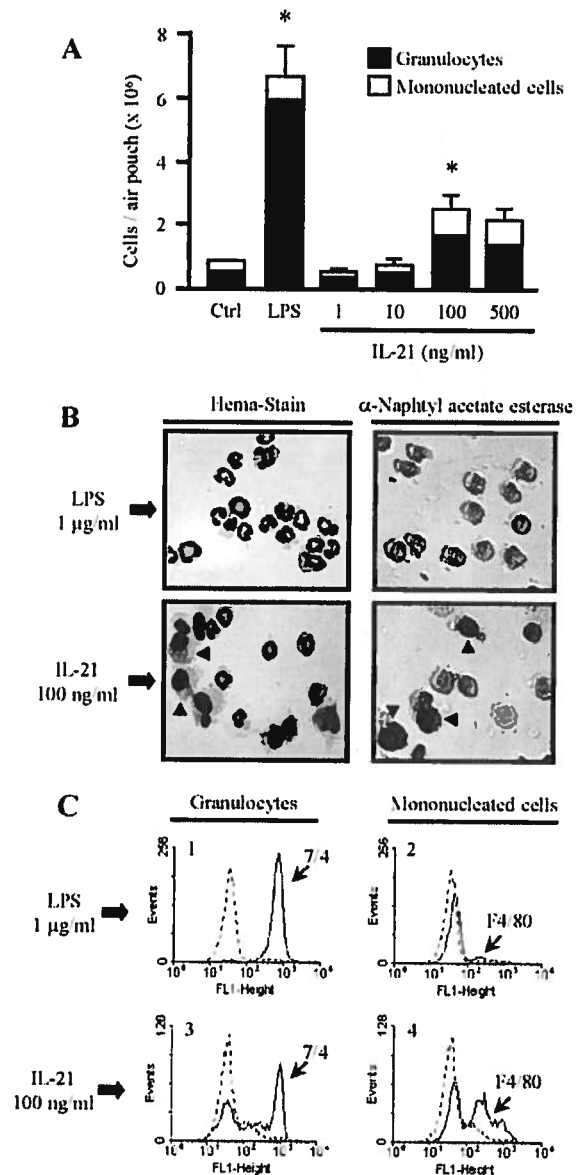


FIGURE 1. IL-21 induces an inflammatory response in vivo. *A*, Dorsal air pouches were raised in CD-1 mice as described in *Materials and Methods* before injecting 1 ml of the buffer (Ctrl), LPS (1 μ g/ml), or IL-21 (1–500 ng/ml) directly into pouch. Six hours later, the exudates were harvested and the number of emigrated total leukocytes was calculated and separated in granulocytes (■) or mononuclear cells (□). Results are means \pm SEM ($n \geq 5$ mice/group). *B*, A representative cytocentrifuged preparation of harvested cells illustrating that the majority of cells attracted by LPS are granulocytes, whereas IL-21 recruits both granulocytes and mononuclear cells (arrowheads). *C*, Cells were stained with purified rat anti-mouse 7/4 mAb directed against murine neutrophils (*panels 1* and *3*, solid line) or rat anti-mouse F4/80 Ag Ab recognizing murine monocyte/macrophages (*panels 2* and *4*, solid line) as described in *Materials and Methods*. Dotted lines, appropriate isotypic controls. *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

whether or not these cells arrive before or after neutrophils. As illustrated in Fig. 2A, the injection of buffer, LPS, or IL-21 into the air pouches did not increase significantly the total number of cells collected after 3 h. Moreover, the cell types found in the collected fluids did not significantly differ between the three groups, although granulocytes already formed the majority of inflammatory

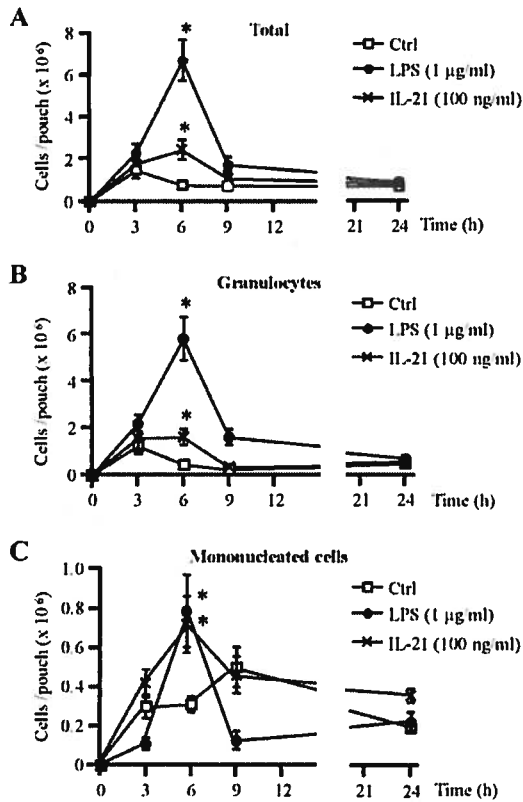


FIGURE 2. Kinetics of the IL-21-induced inflammatory response in vivo. Buffer (Ctrl), IL-21 (100 ng/ml), or LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) was administered into the air pouch as in the Fig. 1 legend and total leukocyte (A), granulocyte (B), or mononuclear cell counts were performed after 3, 6, 9, and 24 h as described in *Materials and Methods*. Results are means \pm SEM ($n \geq 5$ mice/group). *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

cells identified (Fig. 2, B and C). Again, the number of cells was significantly increased after 6 h of treatment with 100 ng/ml IL-21. The response started to decline after 9 h, whether cells were attracted by IL-21 or LPS. More importantly, the inflammatory response induced by IL-21 or by LPS was transient, and was

completely resolved after 24 h, because neither the neutrophils nor the mononuclear cells persist following the treatment.

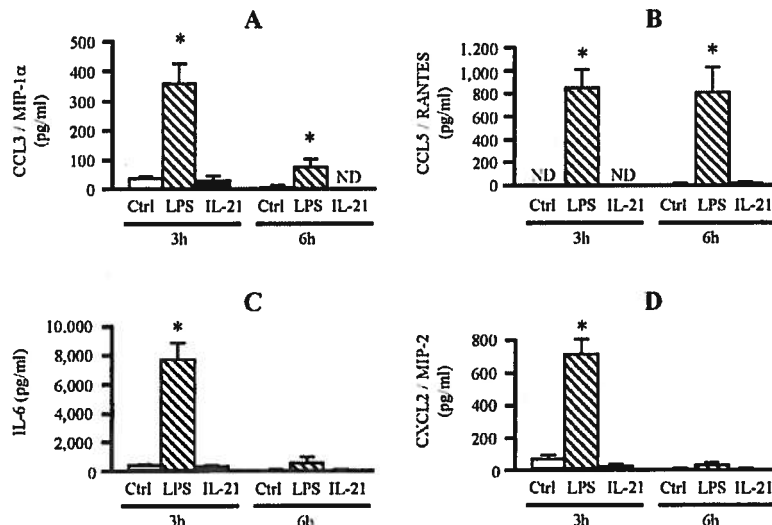
IL-21-induced cell attraction in vivo is not linked to CCL3, CCL5, CXCL2, or IL-6 production

The production of chemokines by neutrophils or by other cells, including those already present at the injection site at the time of stimulation, could explain the recruitment of neutrophils and mononuclear cells by IL-21 in vivo. We verified the presence of increased protein expression of three important chemotactic factors, namely CCL3, CCL5, and CXCL2 and the cytokine IL-6 by ELISA. We selected this latter cytokine because it was found to be increased by LPS in some similar circumstance (30, 31). As illustrated in Fig. 3, IL-21 treatment did not increase the production of the three chemokines and IL-6 but, as expected, LPS increased significantly the production of CCL5, CCL3, CXCL2, and IL-6. These results indicate that the presence of neutrophils and mononuclear cells in IL-21-stimulated mice is not due to local production of CCL3, CCL5, CXCL2, or IL-6. In two separate experiments, we have verified the ability of the different collected air pouch fluids ($n \geq 3$ animals/group) to induce cell attraction in vivo and we found that none of the collected fluids attracted cells in vivo (data not shown).

Human PBMC express IL-21R α but not mature neutrophils

Because we found that IL-21 induced neutrophil and monocyte-macrophage cell attraction in vivo, we reasoned that these cells could be important targets of this cytokine. IL-21 is known to act via its receptor, composed of the specific chain IL-21R α and γ_c . Although γ_c is known to be expressed in these cells, the presence of IL-21R α in neutrophils, unlike PHA-P-induced PBMC (2), is unknown. As illustrated in Fig. 4A, IL-21R α was detected by immunoblotting in PHA-P-induced PBMC after 24–72 h, but not in naive PBMC cells. IL-21R α was not detected in freshly isolated human neutrophils, even if we increased cell loading up to 2×10^6 cells/lane (note the corresponding increased quantity of actin). We next try to detect IL-21R α in 24 h-aged neutrophils that were incubated or not with known neutrophil agonists such as fMLP, LPS, IL-15, PMA, or with IL-21. As illustrated in Fig. 4B, IL-21R α was not detected under these conditions, but as expected, IL-21R α was expressed in PHA-P-induced PBMC.

FIGURE 3. IL-21, in contrast to LPS, attracts granulocytes and mononuclear cells by a mechanism independent of the production of CCL3, CCL5, CXCL2, and IL-6. Air pouches were created as described in *Materials and Methods* and 1 ml of the buffer (Ctrl), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), or IL-21 (500 ng/ml) were administered into the pouch. Exudates were harvested after 3 and 6 h and CCL3, CCL5, CXCL2, and IL-6 production was measured using specific ELISA kits. Results are means \pm SEM ($n \geq 5$). *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.



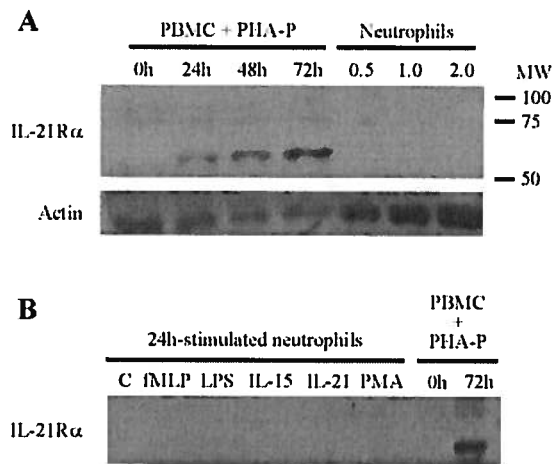


FIGURE 4. Human neutrophils do not express the IL-21R α . Freshly isolated neutrophils or PHA-P-stimulated PBMC (A) or neutrophils stimulated for 24 h with the indicated agonists (B), were lysed, subjected to SDS-PAGE, and immunoblotted with the anti-human IL-21R α or anti-human actin as described in *Materials and Methods*. Results are representative of three different experiments. MW, m.w. standards. PHA-P, FMLP, LPS, IL-15, IL-21, and PMA were used at 2 μ g/ml, 10⁻⁷ M, 1 μ g/ml, 250 ng/ml, 250 ng/ml, and 10⁻⁷ M, respectively.

Down-regulation of IL-21R α during HL-60 cell differentiation toward neutrophil-like phenotype: IL-21 activates Erk-1/2 in HL-60 but not neutrophils

Knowing that neutrophils do not express IL-21R α , but that IL-21 was previously found to bind to immature promyelocytic HL-60 cells, and that IL-21R α expression was not directly studied in these cells (1, 9), we then investigated the expression of IL-21R α in HL-60 cells. As illustrated in Fig. 5A, IL-21R α was detected in

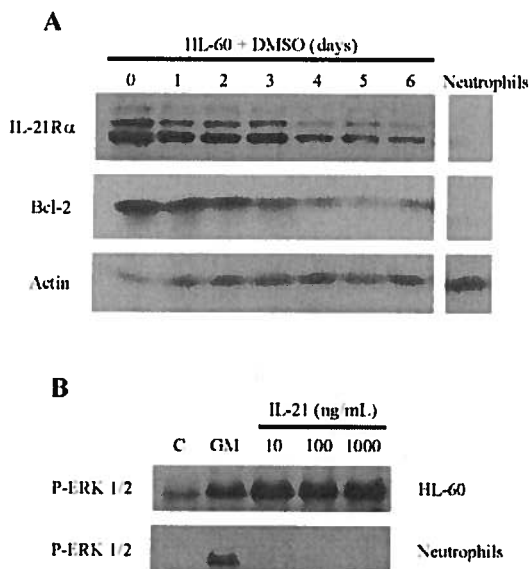


FIGURE 5. IL-21 activates Erk-1/2 in promyelocytic HL-60 cells, but not neutrophils: expression of IL-21R α is down-regulated during differentiation of HL-60 cells toward neutrophils. Untreated or HL-60 treated with 1.25% DMSO (v/v) for the indicated times, and untreated neutrophils (A), GM-CSF- or IL-21-induced HL-60 and neutrophil cells (B) were lysed, subjected to SDS-PAGE, and immunoblotted with the respective Abs as described in *Materials and Methods*. Data shown are representative of at least three different experiments.

HL-60 cells, but its expression decreased over time during differentiation toward neutrophils. The expression of IL-21R α is not completely abolished after 6 days of differentiation; this is explained by the fact that ~75% of cells had differentiated, according to the NBT assay test (data not shown). The different bands detected by the anti-IL-21R α Ab can be explained by the five *N*-linked glycosylation sites present in IL-21R α , resulting in a number of potential *O*-linked glycosylation sites leading to appearance of different polypeptides ranging from 60 to 100 kDa (2). In contrast to actin, expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein decreased over time, indicating efficiency of the differentiation process toward neutrophils (32–34). As expected, actin, but not IL-21R α and Bcl-2, was detected in mature human neutrophils. As with other γ_c (CD132)-dependent cytokines, IL-21 has been found to activate the Jak-STAT pathway (2–4). Recently, the MAPK family members Erk 1/2 were also found to be activated by IL-21 in IL-6-dependent myeloma cell lines (8). We investigated potential activation of Erk-1/2 by IL-21 in HL-60 cells, knowing that these cells express both γ_c (35) and IL-21R α . As illustrated in Fig. 5B, IL-21 induced phosphorylation of Erk-1/2 in HL-60 cells, but not in mature neutrophils. Neutrophils were, however, responsive, because GM-CSF induced phosphorylation of Erk-1/2 (20, 36).

IL-21 is not a human neutrophil agonist in vitro

The presence of neutrophils and mononuclear cells in the IL-21-induced air pouch suggested that IL-21 may activate neutrophils and/or mononuclear cells. Although we found that neutrophils do not express IL-21R α and that IL-21 does not activate Erk-1/2, we decided to investigate potential effects of IL-21 on different neutrophil functions, because we do not know whether neutrophils express any unidentified IL-21-binding component. As illustrated in Fig. 6, IL-21 does not modulate human neutrophil apoptosis as assessed by the FITC-Annexin V binding assay, cell surface expression of CD16, and cytology. Because this response is measured after 24 h, we decided to study the potential effects of IL-21 on neutrophil responses occurring more rapidly. IL-21 did not induce neutrophil O₂⁻ production after 5 (Fig. 7A) or 30 min (Fig. 7B) of stimulation. We verified also whether IL-21 could have a priming effect by increasing the fMLP response. In these experiments, cells were pretreated with IL-21 and then activated with fMLP. As illustrated in Fig. 7C, IL-21, unlike GM-CSF, did not increase the fMLP response. In addition, we demonstrated that IL-21 did not modulate phagocytosis (Fig. 7D), chemotaxis (Fig. 7E), production of CXCL8 (IL-8) (Fig. 7F), and IL-1 β (Fig. 7G). In addition, we also verified whether IL-21 modulated RNA synthesis as assessed by [³H]Juridine uptake (19). We found that IL-21 did not modulate this response (Fig. 7H). Collectively, these data demonstrated clearly that IL-21 is not a neutrophil agonist in vitro.

IL-21 is not a maturation agent for HL-60 cells

Activation of Erk-1/2 has been implicated in several cellular processes, including cell proliferation and differentiation (37). Because phosphorylation of Erk-1/2 occurs in HL-60 cells following stimulation with IL-21, we verified whether IL-21 could induce the proliferation or differentiation of these cells toward neutrophils, monocytes, or macrophages. HL-60 cells were treated for several days with either 10, 100, or 1000 ng/ml IL-21 or DMSO (neutrophil differentiation), Vit D3 (monocyte differentiation), or PMA (macrophage differentiation), and characteristic markers of proliferation and differentiation were analyzed. As illustrated in Fig. 8A, the cell cycle was not altered with IL-21, as compared with DMSO, Vit D3, or PMA treatment, where the majority of the cells were in the G₀/G₁ phase and fewer cells were in the S and G₂/M phases. Microscopic observations (Fig. 8A, panels 1–5) illustrated

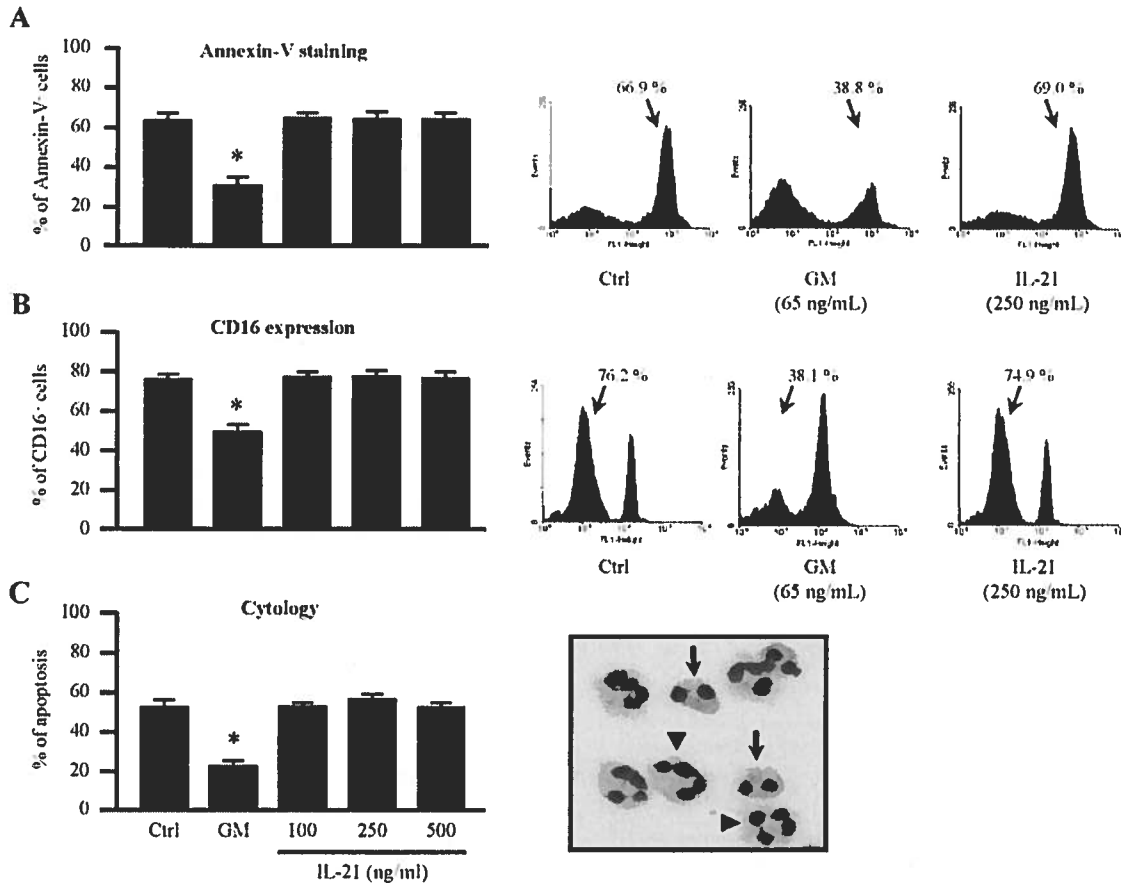


FIGURE 6. IL-21 does not alter neutrophil apoptotic rate. Freshly isolated human neutrophils ($10 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated for 24 h in the presence of buffer (Ctrl), GM-CSF (GM), or the indicated concentrations of IL-21. Apoptosis was assessed by annexin V staining (A), CD16 expression (B), and cytology (C), as described in *Materials and Methods*. Results are means \pm SEM ($n = 4$ different blood donors). Results presented in the right part of each panel illustrate representative data that have been plotted in the corresponding graph. Arrowheads in C illustrate normal neutrophils (segmented nuclei) whereas arrows indicate apoptotic cells. *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

that IL-21, in contrast to DMSO, PMA, and Vit D3, had no effect on HL-60 cells, because cell morphology was identical to that of control cells. For simplicity, only the results obtained with 100 ng/ml IL-21 and after 6 days of treatment are illustrated, because the results were similar with the other conditions.

Changes in cell surface marker expression have been reported during differentiation of HL-60 cells treated with DMSO, Vit D3, and PMA (38). To further demonstrate that IL-21 had no effect on HL-60 cell differentiation, cell surface expression of CD11b and CD14 was analyzed after each treatment. As indicated in Fig. 8B, IL-21 did not alter CD11b and CD14 expression, whereas, as expected, CD11b was up-regulated with DMSO, PMA, and Vit D3 treatment (38). CD14 was up-regulated only with Vit D3 treatment (38). These data demonstrate that IL-21 is not a maturation factor for HL-60 cells.

Expression of IL-21R α by monocytes and monocyte-derived macrophages

Because we demonstrated that human neutrophils do not express IL-21R α and that IL-21 had no effect on human neutrophil functions, we next verified whether IL-21R α is expressed in monocytes and macrophages, because these cells were the other major cell types attracted by IL-21 in the murine air pouch. In parallel, we studied the expression of IL-21R α in HL-60 cells differentiated toward monocytes or macrophages after treatment with Vit D3 or

PMA, respectively. As illustrated in Fig. 9, human monocytes (Fig. 9A) and monocyte-derived macrophages (Fig. 9B) express the IL-21R α . The expression of IL-21R α was maintained during differentiation of HL-60 cells toward monocytes or macrophages. Therefore, both monocytes and macrophages may be direct targets of IL-21.

IL-21 induces human monocyte-derived macrophages to produce CXCL8, but not monocytes

Knowing that human neutrophils do not express IL-21R α and that IL-21 did not induce CXCL8 production in these cells, we questioned whether IL-21 could induce CXCL8 production by human monocytes and/or monocyte-derived macrophages. As illustrated in Fig. 10, macrophages, but not monocytes, increased CXCL8 production in response to IL-21. As expected, LPS induced CXCL8 production in both cell types (data not shown). These results clearly indicate that although monocytes were not activated by IL-21, they were responsive and produced CXCL8.

Discussion

The CD132-dependent cytokines IL-2, IL-4, and IL-15 are proinflammatory cytokines known to play important roles in inflammatory disorders, including rheumatoid arthritis (39). The major aim of the present study was to elucidate the *in vivo* and *in vitro* proinflammatory properties of the recently identified CD132-dependent

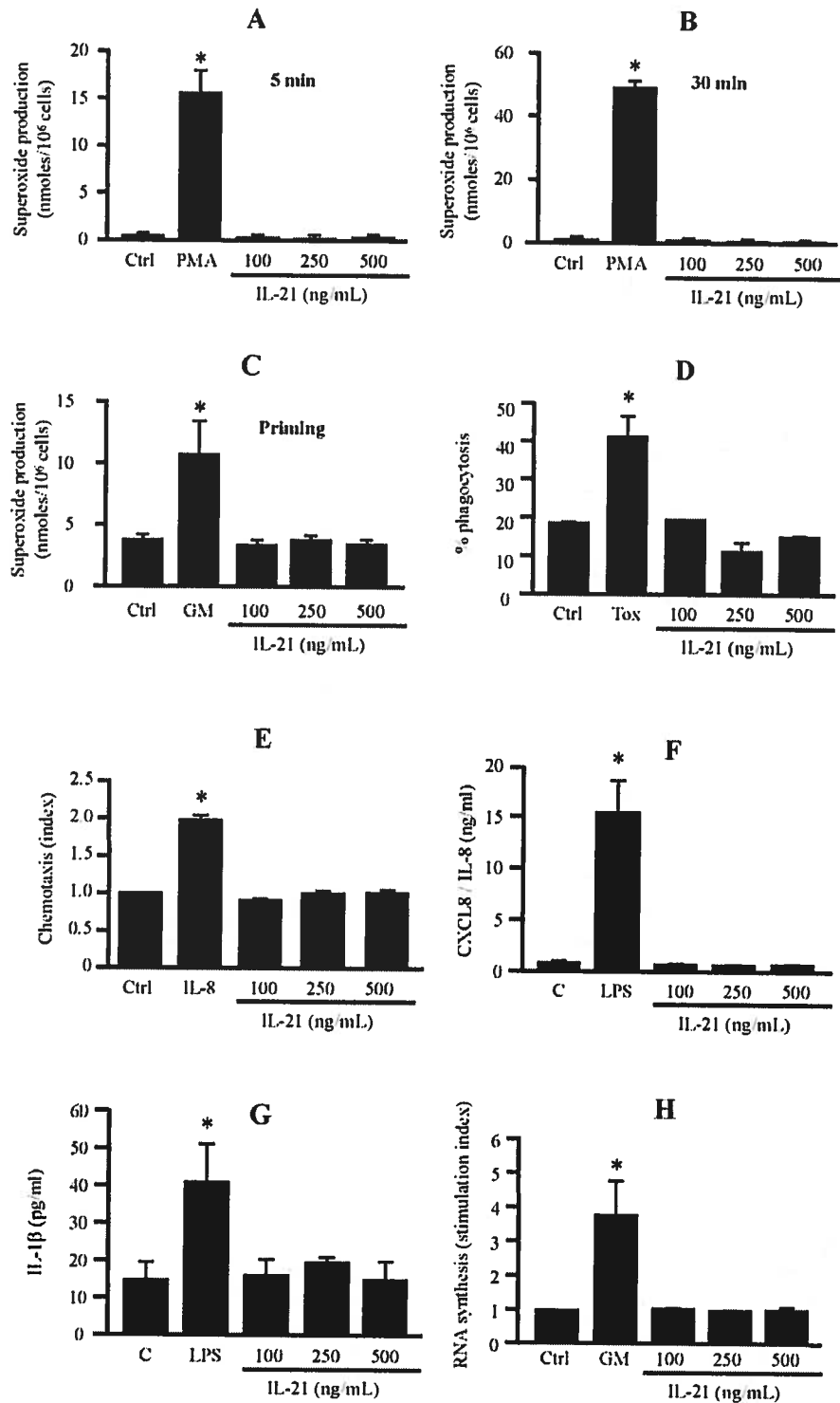


FIGURE 7. IL-21 does not modulate human neutrophil responses. Freshly isolated neutrophils (1×10^6 cells/ml) were treated for 5 min (A) or 30 min (B) with buffer (Ctrl), PMA 10^{-7} M (positive control), or increasing concentrations of IL-21 (100, 250, or 500 ng/ml), and superoxide production was measured by the reduction of cytochrome *c* as described under *Materials and Methods*. Results are means \pm SEM ($n \geq 4$). C, Cells were treated for 30 min with buffer (Ctrl), GM-CSF 65 ng/ml, or IL-21, and then incubated for 5 min with fMLP (10^{-7} M) before measuring superoxide production to verify potential priming effects. D, Phagocytosis was evaluated by determining ingestion of opsonized SRBCs by neutrophils pretreated for 30 min with buffer (Ctrl), 10 μ g/ml toxaphene (Tox), or IL-21. Results are expressed as the percentage of phagocytosis (cells ingesting at least one opsonized SRBC/number of cells counted \times 100). E, Neutrophils were stimulated with CXCL8 (IL-8) (200 ng/ml) or increasing concentrations of IL-21 and in vitro chemotaxis was performed in a 48-well microchemotaxis chamber, as described in *Materials and Methods*. F and G, Production of CXCL8 and IL-1 β were measured by ELISA and RNA synthesis (H) was performed as previously described (14). E and H, results are expressed as a stimulation index (number of cells from tested group/number of cells from control). *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

cytokine, IL-21. In particular, knowing that IL-2, IL-4, and IL-15 activate human neutrophils, and that these cells express CD132 (11), which is an IL-21R subunit, we were interested in knowing whether these cells are important targets of IL-21.

Using the murine air pouch model we have demonstrated that IL-21 induces a neutrophilic and mononuclear inflammation response in vivo, suggesting that these cells are targets to IL-21. However, we found that human neutrophils do not express the IL-21R α component. This could explain why IL-21 does not mod-

ulate O₂⁻ production, phagocytosis, CXCL8 and IL-1 β production, chemotaxis, and RNA synthesis. Because IL-21 was not a chemoattractant for neutrophils in vitro, but attracted them in vivo, we hypothesized that recruitment of neutrophils into air pouches occurred via the production of chemokines by other cell types, including the monocytes and macrophages, which are also attracted in vivo. Although it was beyond the scope of this study to determine which chemokines are involved in IL-21-induced cell attraction, we nevertheless investigated the role of CCL3, CCL5, and

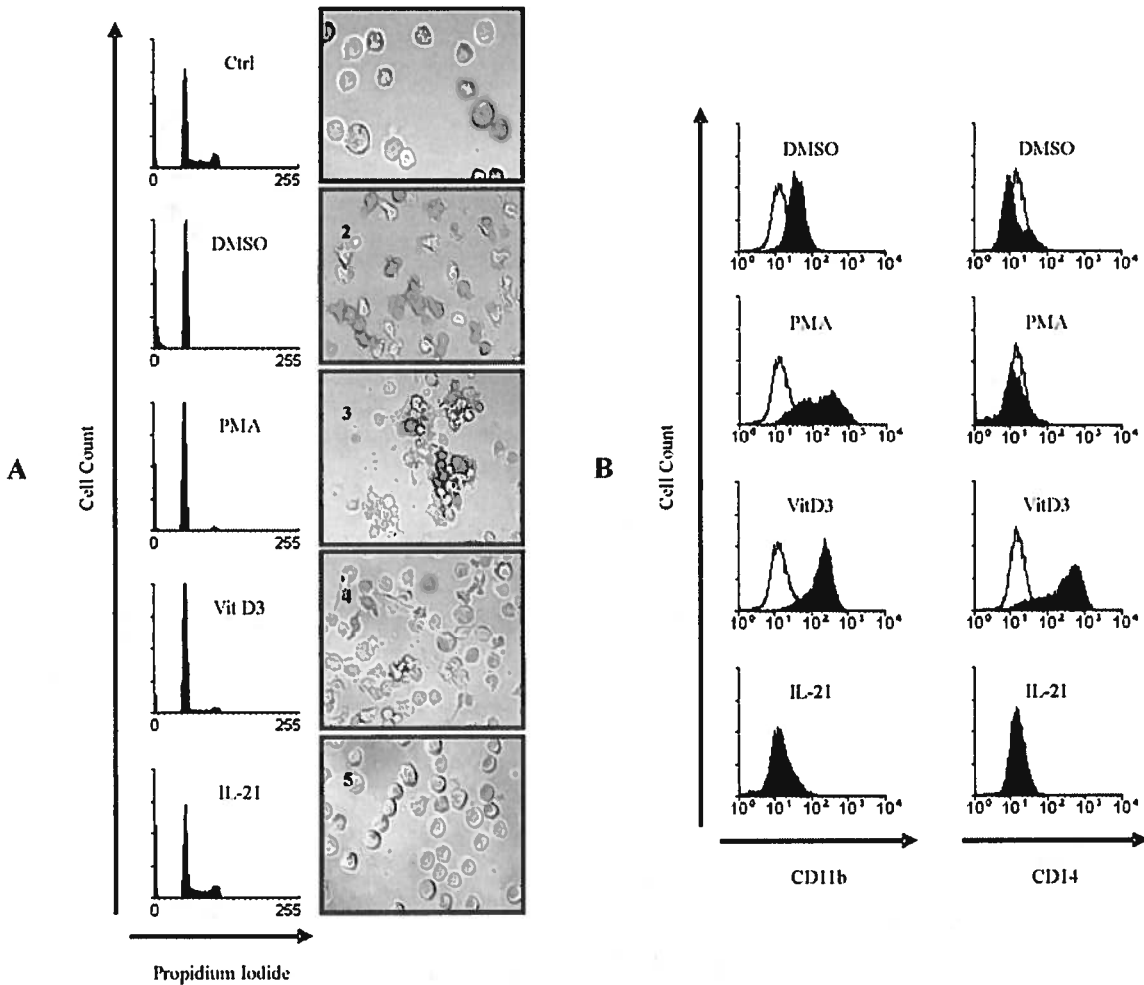


FIGURE 8. IL-21 is not a maturation agent for HL-60 cells. HL-60 cells were treated with 100 ng/ml IL-21, or with 1.25% DMSO (v/v) for neutrophil differentiation; 100 nM Vit D3 for monocyte differentiation; or 10 nM PMA for macrophage differentiation. Cells were harvested after 6 days for DMSO or Vit D3 treatment and after 3 days for PMA treatment. *A*, Cell cycle analysis was evaluated using PI as described in *Materials and Methods*. *Right panels* illustrate corresponding morphological observations monitored by optical microscopy (magnification, $\times 200$). *B*, HL-60 cell surface expression of CD11b and CD14 (filled curve) was monitored by flow cytometry as described in the *Materials and Methods*. Results are representative of three different experiments.

CXCL2, three excellent potential candidates. These chemokines are known to attract neutrophils (40, 41), monocytes, and macrophages (42, 43). However, in contrast to LPS, we did not observe increased expression of these chemokines in the exudates following IL-21 treatment. IL-6 was also another interesting potential candidate, because this cytokine is known to be involved in pneumolysin-induced lung inflammation in mice characterized by a dose-dependent influx of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluids (30). In addition, IL-6 was recently found to be highly expressed in the exudates of hemozoin-induced murine air pouches, characterized by an influx of neutrophil and monocyte populations (31). Again unlike LPS, IL-6 expression was not increased in response to IL-21. These results strongly suggest that IL-21 attracts cells in a manner different from LPS, and by a mechanism that is independent of CCL3, CCL5, CXCL2, and IL-6. This discrepancy is of interest, because IL-21 attracts an important proportion of mononuclear cells into the air pouch as compared with LPS induction. Although the collected fluids from IL-21-induced animals were devoid of chemotactic activity, we do not rule out the possibility that, at a particular time point, some chemotactic factors would be expressed at higher concentrations. However, it is clear

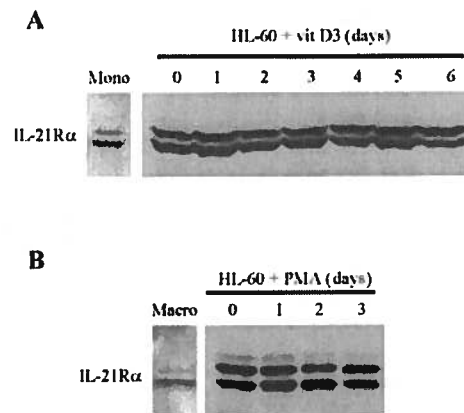


FIGURE 9. IL-21R α is expressed by human monocytes and monocyte-derived macrophages. Monocytes and 7-day monocyte-derived macrophages were isolated as described in *Materials and Methods*. HL-60 cells were treated with 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 (Vit D3) for monocyte differentiation or 10 nM PMA for macrophage differentiation for the indicated periods of time, were lysed, subjected to SDS-PAGE, and immunoblotted with the Ab. Results are from one representative experiment of three.

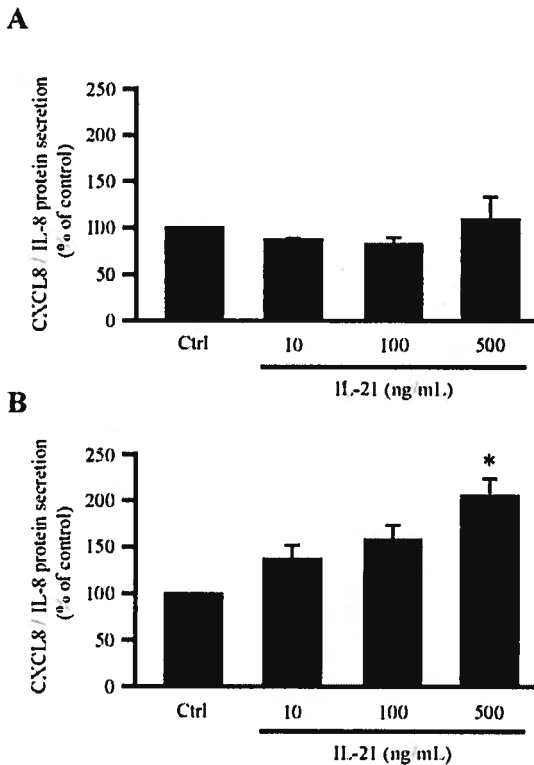


FIGURE 10. IL-21 increases CXCL8 production by monocyte-derived macrophages but not by monocytes. Monocytes (A) and 7-day monocyte-derived macrophages (B) (both at 1×10^6 cells/ml) were incubated for 24 h with buffer (Ctrl) or increasing concentrations of IL-21 (10–500 ng/ml). Supernatants were harvested and CXCL8 (IL-8) concentration was measured using a commercial ELISA kit, as described in *Materials and Methods*. Results are expressed as stimulation indices (CXCL8 produced by stimulated cells/CXCL8 produced by unstimulated cells $\times 100$) ($n \geq 4$). *, $p < 0.05$ by ANOVA. Results varied from experiment to experiment ranging grossly from 25 to 304 pg/ml in untreated vs 54 to 827 in IL-21 (500 ng/ml)-induced macrophages and 14 to 353 ng/ml in untreated vs 13 to 290 in IL-21 (500 ng/ml)-induced monocytes.

that the chemokine profiles induced in response to IL-21 and LPS are distinct and this needs to be addressed.

In vitro, stimulation of human monocyte-derived macrophages by IL-21 resulted in a concentration-dependent production of CXCL8. Interestingly, we did not observe increased CXCL8 expression in IL-21-induced human monocytes. CXCL8 is a potent chemoattractant of human neutrophils and our results suggest that macrophages may be partly responsible for the recruitment of neutrophils in vivo. However, because CXCL8 is not found in mice, additional experiments are needed to identify the human CXCL8-like chemokine(s) involved in neutrophil and mononuclear cell recruitment. The fact that IL-21 does not directly activate neutrophils does not indicate an absence of response by these cells to IL-21. Indirectly, neutrophils could respond to IL-21 via cytokines or chemokines produced by macrophages or other cell types present at the inflammatory site.

The exact role of IL-21/IL-21R α interaction in immature HL-60 cells is currently unclear. However, it is clear that binding of IL-21 to its receptor induces phosphorylation of Erk-1/2. Activation of Erk-1/2 is frequently associated with the first phases of proliferation and differentiation of these cells (44–47). However, this does not appear to be the case in IL-21-induced HL-60 cells. More surprising, IL-21 did not induce HL-60 cell differentiation/matu-

ration toward neutrophils, monocytes or macrophages. This conclusion is supported by the fact that, as expected, cells were responsive to treatment with DMSO, Vit D3, and PMA. Unlike promyelocytes, IL-21 was recently found to induce the functional maturation of murine NK cells (48) and rapid maturation of human CD34⁺ cell precursors toward NK cells (49). This attests to the complexity of the biological action of IL-21.

In this study, one interesting observation is the down-regulation of IL-21R α in HL-60 cells during differentiation toward neutrophil-like phenotype, but not during their differentiation toward monocyte and macrophage phenotypes. This supports the fact that neutrophils do not respond to IL-21, in contrast to mononuclear cells, especially monocyte-derived macrophages, which produce CXCL8 in response to IL-21. The mechanism regulating the down-regulation or the maintenance of IL-21R α during differentiation of HL-60 cells is presently unknown and needs to be investigated.

The presence of neutrophils at tumor sites and their role in tumor rejection is a relatively new concept in immunobiology. Although we have demonstrated that IL-21 is not a neutrophil agonist, we do not rule out the possibility that IL-21 could activate these cells indirectly. The antitumor role of IL-21 is now well established and there is evidence that neutrophils might be involved in the rejection process induced by IL-21 (18). Di Carlo et al. (18) have shown that IL-21-induced tumor rejection required the presence of CD8⁺ T lymphocytes and of granulocytes. Recruitment of neutrophils and macrophages at tumor sites by IL-21 strongly suggests an active role of these cells in the rejection process. Interestingly, absence of granulocytes was found to correlate with a delay in the rejection process (18).

The results of the present study support a potential indirect role of IL-21 on neutrophils via the stimulation of mononuclear cells. We believe that IL-21 plays important roles in inflammation and during activation and/or development of nonlymphoid cells, including promyelocytes, neutrophils, and mononuclear cells. The importance of IL-21R α expression in IL-21-mediated biological action has been previously demonstrated (50). Herein, our results obtained with neutrophils clearly demonstrate that the sole expression of CD132 is insufficient to induce cell signaling in response to IL-21. We conclude that IL-21 is not a direct human neutrophil agonist, but we propose to include IL-21 into the growing list of CD132-dependent cytokines having proinflammatory properties in vivo and in vitro.

Acknowledgments

We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

References

- Parrish-Novak, J., S. R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J. A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, et al. 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408:57.
- Ozaki, K., K. Kikly, D. Michalovich, P. R. Young, and W. J. Leonard. 2000. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor β chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11439.
- Asao, H., C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster, and K. Sugamura. 2001. Cutting edge: the common γ -chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J. Immunol.* 167:1.
- Habib, T., S. Senadheera, K. Weinberg, and K. Kaushansky. 2002. The common γ chain (γ_c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry* 41:8725.
- Brandt, K., S. Bulfone-Paus, D. C. Foster, and R. Ruckert. 2003. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102:4090.
- Ozaki, K., R. Spolski, C. G. Feng, C. F. Qi, J. Cheng, A. Sher, H. C. Morse, 3rd, C. Liu, P. L. Schwartzberg, and W. J. Leonard. 2002. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298:1630.
- Suto, A., H. Nakajima, K. Hirose, K. Suzuki, S. Kagami, Y. Seto, A. Hoshimoto, Y. Saito, D. C. Foster, and I. Iwamoto. 2002. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C ϵ transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood* 100:4565.

8. Brenne, A. T., T. Baade Ro, A. Waage, A. Sundan, M. Borset, and H. Hjørth-Hansen. 2002. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. *Blood* 99:3756.
9. Asano, R., T. Kudo, K. Makabe, K. Tsumoto, and I. Kumagai. 2002. Antitumor activity of interleukin-21 prepared by novel refolding procedure from inclusion bodies expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 528:70.
10. Wang, G., M. Tschoi, R. Spolski, Y. Lou, K. Ozaki, C. Feng, G. Kim, W. J. Leonard, and P. Hwu. 2003. In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res.* 63:9016.
11. Girard, D. 2003. Phenotypic and functional change of neutrophils activated by cytokines utilizing the common cytokine receptor gamma chain. *Chem. Immunol. Allergy* 83:64.
12. Liu, J. H., S. Wei, D. Ussery, P. K. Epling-Burnette, W. J. Leonard, and J. Y. Djeu. 1994. Expression of interleukin-2 receptor γ chain on human neutrophils. *Blood* 84:3870.
13. Djeu, J. Y., J. H. Liu, S. Wei, H. Rui, C. A. Pearson, W. J. Leonard, and D. K. Blanchard. 1993. Function associated with IL-2 receptor- β on human neutrophils: mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2. *J. Immunol.* 150:960.
14. Girard, D., R. Paquin, and A. D. Beaulieu. 1997. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem. J.* 325:147.
15. Girard, D., N. Boiani, and A. D. Beaulieu. 1998. Human neutrophils express the interleukin-15 receptor α chain (IL-15R α) but not the IL-9R α component. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88:232.
16. Girard, D., and A. D. Beaulieu. 1997. Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that γ_c expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83:264.
17. Parrish-Novak, J., D. C. Foster, R. D. Holly, and C. H. Clegg. 2002. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J. Leukocyte Biol.* 72:856.
18. Di Carlo, E., A. Comes, A. M. Orengo, O. Rosso, R. Meazza, P. Musiani, M. P. Colombo, and S. Ferrini. 2004. IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN- γ -dependent CXC chemokines in syngeneic mice. *J. Immunol.* 172:1540.
19. Pelletier, M., C. J. Roberge, M. Gauthier, K. Vandal, P. A. Tessier, and D. Girard. 2001. Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. *J. Leukocyte Biol.* 70:367.
20. Pelletier, M., C. Ratthe, and D. Girard. 2002. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the antiapoptotic 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.
21. Girard, D., M. E. Paquet, R. Paquin, and 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.
22. Komuro, I., N. Keicho, A. Iwamoto, and K. S. Akagawa. 2001. Human alveolar macrophages and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced monocyte-derived macrophages are resistant to H₂O₂ via their high basal and inducible levels of catalase activity. *J. Biol. Chem.* 276:24360.
23. Gauthier, M., C. J. Roberge, M. Pelletier, P. A. Tessier, and D. Girard. 2001. Activation of human neutrophils by technical toxaphene. *Clin. Immunol.* 98:46.
24. Lavastre, V., C. J. Roberge, M. Pelletier, M. Gauthier, and D. Girard. 2002. Toxaphene, but not beryllium, induces human neutrophil chemotaxis and apoptosis via reactive oxygen species (ROS): involvement of caspases and ROS in the degradation of cytoskeletal proteins. *Clin. Immunol.* 104:40.
25. Ratthe, C., M. Pelletier, C. J. Roberge, and D. Girard. 2002. Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin. Immunol.* 105:169.
26. Bignold, L. P., D. G. Harkin, and S. D. Rogers. 1992. Interleukin-8 and neutrophil leucocytes: adhesion, spreading, polarisation, random motility, chemotaxis and deactivation in assays using 'sparse-pore' polycarbonate (nucleopore) membranes in the Boyden chamber. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 97:350.
27. Tessier, P. A., P. H. Naccache, K. R. Diener, R. P. Gladue, K. S. Neote, I. Clark-Lewis, and S. R. McColl. 1998. Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. II. Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF- α . *J. Immunol.* 161:1204.
28. Iida, M., K. Watanabe, M. Tsurufuji, K. Takaishi, Y. Iizuka, and S. Tsurufuji. 1992. Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Infect. Immun.* 60:1268.
29. Nakamura, H., L. A. Herzenberg, J. Bai, S. Araya, N. Kondo, Y. Nishinaka, L. A. Herzenberg, and J. Yodoi. 2001. Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15143.
30. Rijnveld, A. W., G. P. van den Dobbelen, S. Florquin, T. J. Standiford, P. Speelman, L. van Alphen, and T. van der Poll. 2002. Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J. Infect. Dis.* 185:123.
31. Jaramillo, M., I. Plante, N. Ouellet, K. Vandal, P. A. Tessier, and M. Olivier. 2004. Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. *J. Immunol.* 172:3101.
32. Benito, A., D. Grillot, G. Nunez, and J. L. Fernandez-Luna. 1995. Regulation and function of Bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promyelocytic cells. *Am. J. Pathol.* 146:481.
33. Watson, R. W., O. D. Rotstein, J. Parodo, R. Bitar, D. Hackam, and J. C. Marshall. 1997. Granulocytic differentiation of HL-60 cells results in spontaneous apoptosis mediated by increased caspase expression. *FEBS Lett.* 412:603.
34. Santos-Bencil, A. M., and F. Mollinedo. 2000. Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J. Leukocyte Biol.* 67:712.
35. Schumann, R. R., T. Nakarai, H. J. Gruss, M. A. Brach, U. von Arnim, C. Kirschning, L. Karawajew, W. D. Ludwig, J. C. Renaud, J. Ritz, and F. Herrmann. 1996. Transcript synthesis and surface expression of the interleukin-2 receptor (α -, β -, and γ -chain) by normal and malignant myeloid cells. *Blood* 87:2419.
36. Okuda, K., J. S. Sanghera, S. L. Pelech, Y. Kanakura, M. Hallek, J. D. Griffin, and B. J. Druker. 1992. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor induce rapid tyrosine phosphorylation of p42 and p44 MAP kinase. *Blood* 79:2880.
37. Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179.
38. Trayner, I. D., T. Bustorff, A. E. Etches, G. J. Muftic, Y. Foss, and F. Farzaneh. 1998. Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, α ,1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk. Res.* 22:537.
39. Jungel, A., J. H. Distler, M. Kurowska-Stolarska, C. A. Seemayer, R. Seibl, A. Forster, B. A. Michel, R. E. Gay, F. Emmrich, S. Gay, and O. Distler. 2004. Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 50:1468.
40. Pan, Z. Z., L. Parkyn, A. Ray, and P. Ray. 2000. Inducible lung-specific expression of CCL5: preferential recruitment of neutrophils. *Am. J. Physiol.* 279:L658.
41. Zeng, X., T. A. Moore, M. W. Newstead, R. Hernandez-Alcocega, W. C. Tsai, and T. J. Standiford. 2003. Intrapulmonary expression of macrophage inflammatory protein 1 α (CCL3) induces neutrophil and NK cell accumulation and stimulates innate immunity in murine bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* 71:1306.
42. Uguccioni, M., M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald, and M. Baggiolini. 1995. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, CCL5, CCL3 α and CCL3 β on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25:64.
43. von Stebut, E., M. Metz, G. Milon, J. Knop, and M. Maurer. 2003. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on CCL3 α/β released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNF α . *Blood* 101:210.
44. Yen, A., M. S. Roberson, S. Varvayanis, and A. T. Lee. 1998. Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. *Cancer Res.* 58:3163.
45. Yen, A., M. S. Roberson, and S. Varvayanis. 1999. Retinoic acid selectively activates the ERK2 but not JNK/SAPK or p38 MAP kinases when inducing myeloid differentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35:527.
46. Wang, X., and G. P. Studzinski. 2001. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) defines the first phase of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of HL60 cells. *J. Cell. Biochem.* 80:471.
47. Miranda, M. B., T. F. McGuire, and D. E. Johnson. 2002. Importance of MEK-1/2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia* 16:683.
48. Brady, J., Y. Hayakawa, M. J. Smyth, and S. L. Nutt. 2004. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J. Immunol.* 172:2048.
49. Sivori, S., C. Cantoni, S. Parolini, E. Marcanaro, R. Conte, L. Moretta, and A. Moretta. 2003. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34⁺ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur. J. Immunol.* 33:3439.
50. Kasaian, M. T., M. J. Whitters, L. L. Carter, L. D. Lowe, J. M. Jussif, B. Deng, K. A. Johnson, J. S. Witke, M. Senices, R. F. Konz, et al. 2002. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16:559.

Chapitre 7 : Article V

Mise en contexte

La présence de l'IL-21R α chez les cellules immatures HL-60 nous a incité à envisager un rôle de l'IL-21 dans la prolifération et la survie de cellules immatures (Pelletier *et al.*, 2004). Nous avons donc isolé les cellules de la moelle osseuse de la souris afin de les stimuler avec l'IL-21 et l'IL-15 dans le but d'examiner l'effet de ces cytokines sur la prolifération et l'apoptose induite par la privation de facteurs essentiels. Nous avons également séparé les populations myéloïdes (CD11b⁺) et lymphoïdes (CD11b⁻) afin de vérifier les effets de l'IL-21 et de l'IL-15 sur chacune de ces fractions. Finalement, nous avons voulu vérifier l'importance de NF- κ B dans la modulation de la prolifération et/ou de l'apoptose induite par l'IL-15 et l'IL-21. En effet, il a récemment été montré que le facteur de transcription NF- κ B est activé par l'IL-15 dans les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules CD34⁺ (progéniteurs hématopoïétiques) (McDonald *et al.*, 1998b; Hoontrakoon *et al.*, 2002; Giron-Michel *et al.*, 2003). Il a également été démontré que l'IL-21 active ERK1/2, mais pas NF- κ B, dans les lignées cellulaires dépendantes de l'IL-6, OH-2 et IH-1 (Brenne *et al.*, 2002). Il a également été montré que l'IL-21 n'augmente pas l'accumulation nucléaire de NF- κ B, ne module pas l'accumulation nucléaire induite par le LPS dans les lymphocytes B de la rate et n'induit pas la liaison de NF- κ B p50 et NF- κ B p65 au promoteur du gène de l'IFN- γ dans les cellules NK-92 (Suto *et al.*, 2002; Strengell *et al.*, 2003). Ainsi, nous avons privilégié l'utilisation de souris déficientes pour le facteur de transcription NF- κ B p50 pour évaluer les effets de l'IL-15 et de l'IL-21.

Plus spécifiquement, nous voulions examiner si :

- i) l'IL-15 et l'IL-21, tout comme le LPS, modulent la prolifération et l'apoptose induite par la privation de facteurs essentiels des cellules de la MO ;

- ii) les effets de l'IL-15 et de l'IL-21 sont principalement observés dans les cellules myéloïdes (CD11b⁺) et/ou les cellules lymphoïdes (CD11b⁻) de la MO ;
- iii) la modulation des effets de l'IL-15 et de l'IL-21 corrèle avec l'expression par les différentes populations de la moelle osseuse (totales, myéloïdes et lymphoïdes) des chaînes spécifiques (IL-15R α et IL-21R α) des récepteurs de ces deux cytokines ;
- iv) le facteur de transcription NF- κ B p50 joue un rôle dans la modulation de la prolifération et/ou de l'apoptose des cellules de la MO par l'IL-15 ou l'IL-21.

Résumé français

Differential effects of IL-15 and IL-21 in myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) bone marrow cells

Martin Pelletier et Denis Girard

Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, Québec, H9R 1G6, Canada.

Il a été montré que l'IL-15 active NF- κ B dans plusieurs types cellulaires. Toutefois, le rôle de ce facteur de transcription dans l'activation des cellules de la moelle osseuse (MO) par l'IL-15 et l'IL-21 n'a pas encore été élucidé. Nous démontrons que l'IL-15 et l'IL-21 retardent l'apoptose des cellules de la MO, mais seule l'IL-15 induit leur prolifération. Suite à la séparation des cellules de la MO en population myéloïde (CD11b⁺) et lymphoïde (CD11b⁻), nous avons observé que seule l'IL-15 induit la prolifération de ces deux populations cellulaires. Les deux cytokines ont la capacité de retarder l'apoptose induite par la privation de facteurs essentiels des cellules CD11b⁻. De pair avec ces résultats, nous démontrons que l'IL-15R α est exprimé par les deux populations cellulaires alors que l'IL-21R α n'est exprimé que par les cellules CD11b⁻. De plus, nous démontrons que la prolifération des cellules de la MO induite par l'IL-15 est significativement inhibée chez les souris NF- κ Bp50^{-/-} comparativement aux souris de type sauvage. La capacité de retarder l'apoptose des cellules de la MO par l'IL-15 et l'IL-21 était légèrement réduite chez les souris NF- κ Bp50^{-/-}, alors que l'effet anti-apoptotique du LPS était entièrement inhibé. Nous concluons que l'IL-15, mais pas l'IL-21, induit la prolifération des cellules de la MO et que ces deux cytokines retardent l'apoptose induite par la privation de facteurs essentiels. Ces effets biologiques sont préférentiellement dirigés vers les cellules lymphoïdes. L'utilisation de souris NF- κ Bp50^{-/-} nous a permis de

démontrer que NF- κ B joue un rôle plus important dans la prolifération induite par l'IL-15 que le retard d'apoptose induit par l'IL-15 et l'IL-21.

Manuscrit sous révision au *Journal of Immunology*.

Contributions des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article. Le Dr Girard et moi-même avons analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

Differential effects of IL-15 and IL-21 in myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) bone marrow cells

Differential effects of IL-15 and IL-21 in myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) bone marrow cells.¹

Martin Pelletier 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.quebec.ca

Keywords: Bone marrow, NF- κ Bp50, cytokines, apoptosis

Running title: Activation of bone marrow cells by IL-15 and IL-21

¹*This study was partly supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR)(MOP-89534) MP holds PhD CIHR award, and DG is a Scholar from FRSQ.*

ABSTRACT

IL-15 has been found to activate NF- κ B in various type of cells. However, the role of this transcription factor in IL-15- and IL-21-stimulated murine bone marrow (BM) cells is unclear. Herein, we demonstrated that both IL-15 and IL-21 are capable of delaying BM cells factor deprivation-induced apoptosis, but only IL-15 induced their proliferation. Following separation of BM cells into myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) cell populations, we found that IL-15, but not IL-21, significantly induced proliferation in both cell populations. Both cytokines significantly delayed apoptosis, but only in CD11b⁻ BM cells. IL-15R α was expressed in both populations, whereas IL-21R α was expressed only in CD11b⁻ BM cells. In addition, we demonstrated that IL-15-induced BM cell proliferation was significantly inhibited in NF- κ Bp50^{-/-} mice when compared to littermate controls. The ability of IL-15 and IL-21 to delay BM cell apoptosis was slightly inhibited in NF- κ Bp50^{-/-} mice, whereas the anti-apoptotic effect of LPS was markedly reversed. We conclude that IL-15, but not IL-21, induces BM cell proliferation and that both cytokines delay BM cell apoptosis. These biological activities were preferentially observed in CD11b⁻ BM cells. Using NF- κ Bp50^{-/-} mice, we demonstrated that NF- κ B plays a greater role in IL-15-induced cell proliferation than in IL-15- and IL-21-induced suppression of apoptosis.

INTRODUCTION

Interleukin (IL)-15 and IL-21 are members of the CD132 (γ c)-dependent cytokine family which also includes IL-2, IL-4, IL-7 and IL-9¹⁻⁴. Structurally, IL-21 is most closely related to IL-2, IL-4 and IL-15. Although IL-21 is not itself a potent mitogenic factor, it has been found to promote the expansion and maturation of NK cells from bone marrow (BM) progenitor cells in vitro, in synergy with Flt-3 ligand and IL-15^{5,6}. However, it was reported, in one study, that IL-21 induced proliferation of three different IL-6-dependent human myeloma cell lines, OH-2, ANBL-6 and 1H1⁷. In contrast to IL-21, the role of IL-15 as a mitogenic factor is better established. IL-15 is known to induce the proliferation of a variety of cells and is known as a potent growth factor, particularly for T and B lymphocytes as well as for NK cells⁸⁻¹⁰. Recently, a synergism between IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function was reported¹¹. IL-21 was also shown to be a growth and survival factor for human myeloma cells⁷ and to display antitumor activity¹², like IL-15^{13,14}.

IL-15 and IL-21 are known to mediate their biological activities through their respective receptors (R), IL-15R and IL-21R. These receptors, as well as IL-2R, IL-4R, IL-7R and IL-9R, share the CD132 component (or γ c chain)¹. In addition to this latter component, the IL-15R is composed of a specific IL-15R α chain and the IL-2/15R β subunit. The only other component of the IL-21R is IL-21R α ^{1,15}. Both cytokines are known to mediate their effects through activation of Janus kinase (Jak)/signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway, but they also activate other pathways, including the

mitogen-activated protein kinase (MAPK). Although IL-15 is known to activate nuclear factor (NF)- κ B in different experimental conditions¹⁶⁻¹⁹, the role of this transcription factor in IL-21-induced biological activity is not clear. For example, it was reported in one study that IL-21 did not activate NF- κ B in the myeloma OH-2 cell line⁷. In another study, it was reported that IL-21 did not increase nuclear accumulation of NF- κ B in splenic B cells^{7a}.

Previous observations have suggested that IL-21 was a pro-inflammatory cytokine^{12,20,21}, a suggestion in line with our recent findings that IL-21 is a pro-inflammatory cytokine *in vivo*, based on recruitment of neutrophil and monocyte populations in the murine air pouch model²². In contrast to LPS, administration of IL-21 into the air pouch did not significantly increase the concentration of IL-6, CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES) and CXCL2 (MIP-2). *In vitro*, IL-21 induced the release of CXCL8 (IL-8) by human monocyte-derived macrophages. Interestingly, we demonstrated that although IL-21 is not a direct human neutrophil agonist, this cytokine activated human promyelocyte HL-60 cells by inducing phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases-1/2 (ERK1/2)²². This correlates with the presence of IL-21R α in HL-60 cells and its absence in human neutrophils. Recently, we demonstrated that IL-15 also attracted neutrophils in the same *in vivo* model²³.

IL-15 is known as a general inhibitor of apoptosis, since it suppresses or delays apoptosis in virtually all cells tested. A good example of IL-15's potent ability to inhibit apoptosis is the study conducted by Bulfone-Paus *et al.* (1997) in which anti-Fas-induced lethal

multisystem apoptosis in mice was suppressed by an IL-15-IgG2b fusion protein²⁴. In contrast to IL-15, IL-21 possesses both pro-and anti-apoptotic properties. Kasaian *et al.* (2002), studied the effect of IL-21 on IL-15-expanded murine splenic cultures re-stimulated for 2 days with IL-15 or IL-21. IL-21 was found to delay apoptosis caused by removal of IL-15 after 1 day, whereas the majority of NK cells in the culture were apoptotic after 2 days²⁵. Others reported that IL-21 induced apoptosis in murine B cells²⁶.

While IL-15 is known to activate immature cells isolated from BM or cord blood^{16,27,28}, the role of IL-21 in such cells is not clear. Based on the above differential effects between IL-15 and IL-21, we conducted this study in order establish the role of IL-15 and IL-21 on murine BM cell proliferation and apoptosis, as well as to elucidate the role of NF- κ B in IL-15 or IL-21-stimulated BM cells. In addition, we investigated the role of each cytokine on two major murine BM leukocyte cell populations, namely the myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) cells.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, reagents and antibodies. Recombinant murine (rm) IL-15 was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ) and rmIL-21 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The goat anti-mouse IL-15R α antibody, the goat anti-mouse IL-21R antibody and the isotypic normal goat IgG were from R&D Systems. The monoclonal anti-actin (clone AC-40) from mouse ascites fluid was from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, Ontario). The polyclonal rabbit anti-human NF- κ Bp50 (C20) was from Delta Biolabs (Campbell, CA) and the polyclonal rabbit anti-mouse I κ B β (C-20) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG and FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Annexin-V FITC conjugate was purchased from Biosource International Inc. (Camarillo, CA). [Methyl- 3 H]-thymidine was from ICN Pharmaceuticals Inc. (Costa Mesa, CA). Ribonuclease A (RNase), lipopolysaccharides (LPS), human IgG, propidium iodide (PI) and methylthiazole tetrazolium (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich Canada.

Mice. C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories (St. Constant, Quebec). Mice homozygous for the p50NF- κ B1 mutation (B6;129P2-*Nf κ b1*^{tm1Ba1}/J) and their littermate controls (B6;129PF2/J) were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine).

Bone marrow cells preparation. Mice were killed by CO₂ asphyxiation and bone marrow (BM) was extracted from both femurs with 5 ml RPMI using a 26-gauge needle. Bone marrow cells were washed (1200 rpm, 10 min, 4°C) and red blood cells were removed using a lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 1mM KHCO₃ and 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2) (10 min at room temperature). Remaining cells were washed prior to passage through a pasteur pipette containing nylon wool. Cells were washed twice and viability (> 95%) was systematically evaluated before and after each experiment using the trypan blue exclusion assay. Cells (0.5x10⁶ cells/ml RPMI-Hepes-P/S-10% foetal calf serum) were incubated with IL-15 (0.1, 1.0, 10 and 100 ng/ml), IL-21 (0.1, 1.0, 10 and 100 ng/ml) or LPS (100 ng/ml) (positive control) for 72h.

Magnetic separation of myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) cells from bone marrow. Positive selection of myeloid cells from mouse bone marrow was performed using CD11b microbeads from Miltenyi Biotec (Auburn, CA) on a MACS LS column according to manufacturer's instructions. In mouse, the CD11b antigen is expressed on monocytes/macrophages, and to a lesser extent on granulocytes, NK cells, CD5⁺ B1 cells and a subset of dendritic cells. Briefly, prepared BM cells were suspended in 90 µl of buffer (degassed PBS pH 7.2, 0.5% BSA and 2 mM EDTA) and 10 µl of CD11b microbeads per 10⁷ cells. Cells were mixed and incubated for 15 minutes at 4°C. Cells were then washed and suspended in 500 µl of buffer before applying cell suspension onto the prepared LS column. Unlabeled fraction (CD11b⁻ lymphoid cells) was collected by washing the column three times with 3 ml of buffer. The column was then removed from the separator and the magnetically labeled fraction (CD11b⁺ myeloid cells) was flushed

out with 5 ml of buffer by applying the plunger supplied with the column. Cells were washed and viability (> 95%) was also evaluated using trypan blue. Purity of each fraction was evaluated by flow cytometry analysis and by microscopy (cytospins stained with Hema-Stain)²². Cells (0.5×10^6 cells/ml RPMI-Hepes-P/S-10% FCS) were then incubated with IL-15 (0.1, 1.0, 10 and 100 ng/ml), IL-21 (0.1, 1.0, 10 and 100 ng/ml) or LPS (100 ng/ml) (positive control) for 72h.

Mitochondrial activity evaluation using MTT. MTT (final concentration 0.5 mg/ml) was added into each well for 3h at 37°C. Plates were spun and supernatants were removed. DMSO (200 μ l) was added to each well and absorbance was evaluated at 570 nm (reference wavelength at 690 nm) using a plate reader.

Proliferation assay using [³H]-thymidine. [³H]-thymidine (1 μ Ci) was added 24h before cells were collected onto borosilicate glass fiber paper with a multiple-cell culture harvester (Skatron Instruments Inc., Sterling, VA). Sections of the filter corresponding to each microwell were then punched out and placed into scintillation counting vials with 4 mL of ScintiSafe Econo 1 (Fisher Scientific Canada, St. Laurent, Québec) and placed in a β -counter. Results are expressed as stimulation indices (cpm from tested cells/cpm from cells treated with buffer alone).

Assessment of apoptosis by Annexin-V. After 72h of incubation, cells were collected, washed twice with PBS and suspended in 100 μ l binding buffer containing 3 μ l of Annexin-V FITC²². Cells were incubated 15 min at room temperature (light protected)

before FACS analysis. Flow cytometry analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (BD Biosciences).

Assessment of apoptosis by propidium iodide staining. Cells were harvested and washed twice with PBS. Cells were then fixed in cold 70% ethanol for at least 30 minutes at 4°C. Cells were washed twice with PBS-2% FCS and treated with 100 µg/mL RNase A. Propidium iodide (50 µg/mL) was added and cells were analysed by flow cytometry²². Apoptosis was determined as the percentage of sub-diploid (sub-G0/G1) cells from a cell cycle profile.

Immunoblotting. Cells were lysed in 2X Laemmli's sample buffer and aliquots corresponding to 0.5×10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred from gel to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Nonspecific sites were blocked with 5% nonfat dry milk (Carnation, Don Mills, Ontario) (anti-mIL-21R α) in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween 20) for 1 h at room temperature. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated overnight at 4°C with goat anti-murine IL-21R α at 1 µg/ml in TBS-Tween + 1% BSA. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with a rabbit anti-goat HRP secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk, followed by washes. Membranes were revealed with ECL. Membranes were stripped with agitation for 30 min at 65°C with stripping buffer (100 mM 2-ME, 2% SDS, 62.5 mM Tris, pH 6.7) and washed extensively with TBS-Tween. Membranes were blocked with either TBS-Tween + 2% BSA for 1h at room

temperature (anti-actin) or TBS-Tween + 1% BSA (anti-NF- κ Bp50 and anti-I κ B β) overnight at 4°C. Membranes were then probed overnight at 4°C with mouse anti-actin (3 μ g/ml) in TBS-Tween + 1% BSA or 1h at room temperature with rabbit anti-NF- κ B p50 (C-20) 1:250 or rabbit anti- I κ B β p45 1:500 in TBS-Tween + 1% BSA. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-mouse HRP secondary Ab at 1:20,000 in TBS-Tween + 2% BSA (anti-actin) or with goat anti-rabbit HRP secondary Ab at 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk (anti-NF- κ Bp50 and anti-I κ B β) followed by washes. Membranes were revealed with ECL.

Evaluation of murine IL-15R α expression. Murine IL-15R α expression was evaluated by flow cytometry. Briefly, cells (5×10^6 cells/ml) were suspended in PBS containing 5 μ g/ml human IgG for 30 min at 4°C to block FcRs and then washed with PBS. Cells were stained in 100 μ l PBS for 30 min at 4°C with 3 μ g/ml goat anti-murine IL-15R α or 3 μ g/ml goat IgG (isotypic control). Cells were washed twice and incubated in 50 μ l PBS containing 10 μ g/ml FITC rabbit anti-goat for 30 min at 4°C. Cells were washed twice and analysis was performed with a FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows Version 3.0 with either a one-way analysis of variance (ANOVA) or a two-way ANOVA. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

IL-15, but not IL-21, induced bone marrow cells to proliferate.

IL-15 is known to activate proliferation in a variety of cells^{1,8,10,16}, whereas IL-21 is not well-recognized as a direct mitogenic cytokine⁵. Herein we were interested in answering whether or not these cytokines can induce murine BM cell proliferation. As illustrated in **Fig.1A**, IL-15, but not IL-21, induced cell proliferation, as assessed by [³H]-thymidine incorporation, in a concentration-dependent manner. We have also verified the effect of IL-15 and IL-21 at higher concentrations (up to 1000 ng/ml) and observe that IL-15 further increased cell proliferation, whereas IL-21 did not (*data not shown*). In parallel, we investigated potential effects of IL-15 and IL-21 on mitochondrial activity using the MTT assay. We expected an effect only for IL-15, since this assay is frequently used for measuring cell proliferation. However, as illustrated in **Fig. 1B**, both IL-15 and IL-21 significantly increased the response in the MTT assay, suggesting that BM cells expressed functional IL-15R and IL-21R. Note that LPS, a broad spectrum agonist used as a positive control, also increased both [³H]-thymidine incorporation and mitochondrial activity.

The cytokines IL-15 and IL-21 delayed bone marrow cells apoptosis.

Because IL-15 is known as a potent anti-apoptotic cytokine, and IL-21 increased mitochondrial activity, we investigated the effects of IL-15 and IL-21 on BM cells factor deprivation-induced apoptosis. BM cells were incubated for a period of 3 days without addition of any factors, except FCS and IL-15 or IL-21. As illustrated in **Fig 2**, both IL-15

and IL-21 significantly suppressed BM cell apoptosis, as assessed by two different methods, FITC-annexin V binding assay (**Fig. 2A**) and DNA staining with PI (**Fig. 2B**).

IL-15, but not IL-21, induced cell proliferation in myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) bone marrow cell populations.

Since we demonstrated that IL-15 induced BM cell proliferation, we next investigated the effect of IL-15 (and IL-21 in parallel as a negative control) on the proliferation of BM cells separated into myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) cell populations (**Fig. 3A** and **Fig. 3B**). As illustrated in **Fig. 3**, IL-15, but not IL-21, induced the proliferation of both myeloid (**Fig. 3C**) and lymphoid (**Fig. 3D**) cell populations. Of note, IL-15 was more effective on cells of lymphoid origin than cells of myeloid origin, since cell proliferation was increased by ~11 fold vs ~4 fold respectively. Both cytokines increased the MTT assay response in a concentration-dependent manner (**Fig. 3E** and **Fig. 3F**), but only IL-15 significantly induced mitochondrial activity in BM cells of lymphoid origin.

IL-15 and IL-21 delayed apoptosis, especially in bone marrow cells of lymphoid origin.

Since we previously demonstrated that IL-15 and IL-21 modulated apoptosis of BM cells, we next investigated the role of these two cytokines in delaying apoptosis of CD11b⁻ and CD11b⁺ BM cells. As illustrated in **Fig. 4**, both IL-15 and IL-21 significantly delayed apoptosis in BM lymphoid cells, but neither cytokine significantly delayed apoptosis in BM myeloid cells.

Expression of IL-15 and IL-21 receptors in bone marrow cells.

We next verified the expression of IL-15R α and IL-21R α in total, CD11b $^{-}$ and CD11b $^{+}$ BM cells in order to confirm if a lack of biological activity in response to these cytokines was related to absence of cytokine receptor expression. As illustrated in **Fig. 5A**, BM cells expressed IL-15R α in both CD11b $^{+}$ and CD11b $^{-}$ cells, as assessed by flow cytometry. Because the anti-IL-21R α antibody was inefficient in flow cytometry (*data not shown*), we performed western blot experiments and found CD11b $^{-}$ cells, but not CD11b $^{+}$, expressed IL-21R α (**Fig. 5B**).

Involvement of NF- κ Bp50 in IL-15-induced bone marrow cell proliferation.

Since IL-15 is known to activate NF- κ B for mediation of cell signalling¹⁶⁻¹⁹, we investigated the potential role of this transcription factor in IL-15-stimulated BM cells isolated from mice deficient in NF- κ B p50, using LPS as a positive control²⁹⁻³¹. We also investigated the role of this transcription factor in IL-21-stimulated BM cells, since NF- κ B activation by IL-21 is poorly documented. As illustrated in **Fig. 6A**, **Fig. 6B** and **Fig. 6C**, mitochondrial activity was increased by IL-15 and IL-21 in BM cells, whether cells were isolated from NF- κ Bp50 $^{-/-}$ (KO) or NF- κ Bp50 $^{+/+}$ (WT) mice. The response was not significantly decreased in KO vs WT mice. Mitochondrial activity was increased by LPS in both WT and KO mice, but this was significantly reduced only in KO mice. The ability of IL-15 and LPS to induce BM cell proliferation was significantly decreased in KO vs WT mice (**Fig. 6D** and **Fig. 6E**), but not totally reversed. As expected, IL-21 did not modulate BM cell proliferation in both WT and KO mice.

Role of NF- κ Bp50 in IL-15 or IL-21-induced suppression of bone marrow cell apoptosis.

We next investigated the role of NF- κ B in IL-15-induced suppression of BM cell apoptosis. Interestingly, the basal level of BM cell factor deprivation-induced apoptosis was decreased in KO mice vs WT, suggesting that BM cells from mice lacking NF- κ Bp50 are more refractory, therefore, less likely to undergo apoptosis (**Fig. 7A** and **Fig. 7B**). The anti-apoptotic effect of IL-15 and IL-21 was slightly reversed in KO mice, but markedly reversed in LPS-induced BM cells. The results differ slightly, depending on the assay used for evaluating BM cell apoptosis. IL-15 and IL-21 significantly delayed BM cell apoptosis in KO mice as assessed by PI staining, whereas the slight decrease observed when using FITC-annexin V was not significant. On the other hand, the anti-apoptotic effect of LPS was markedly reversed in KO mice (**Fig. 7A** and **Fig 7B**). The differences observed between WT and KO mice cannot be attributed to the expression of receptors, since no differences were observed between both groups (**Fig. 7C**).

DISCUSSION

This is the first study investigating the biological activity of IL-15 and IL-21 on murine BM cell by focusing on *i*) proliferation and apoptosis in unfractionated cells, as well as in myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) cell populations and *ii*) the role of NF- κ B in BM cell activation. We found that IL-15, but not IL-21, induced total BM cell proliferation. This biological activity of IL-15 is in agreement with previous studies, which have reported that IL-15 is itself mitogenic^{8-10,32}. Although IL-21 was recently found to induce proliferation in IL-6-dependent human myeloma cell lines⁷ and in adult-T-cell leukemia cells³³, we did not observe any mitogenic effect of IL-21 on murine BM cells. In humans, IL-21 was also reported as a non-mitogenic cytokine in isolated B cells⁵. A synergism between IL-21 and IL-15 has been recently reported in regulating CD8⁺ T cell expansion and functions¹¹. In preliminary experiments, we have treated BM cells with 10 ng/ml IL-15 and 10 ng/ml of IL-21, a concentration that has no significant effect on mitochondrial activity when these cytokines are used alone, and observed that it significantly induced mitochondrial activity by a factor of 1.5 (*data not shown*).

Interestingly, IL-21 increased mitochondrial activity, suggesting that some BM cells express functional IL-21R. The presence of IL-21R was previously detected in C57BL/6 BM cells³⁴. A recent study from Jin *et al.* (2004), reported that IL-21R was expressed on a variety of murine cell lines, including some B and T cell lines³⁵. IL-21R α was not expressed in 3 different pre-B cell lines, in macrophages (tested in the P338D1 cell line) and in fibroblasts. In bone marrow, it was demonstrated that IL-21R was negligibly

expressed on CD43^{high}IgM⁻B220^{low} pro-B cells, weakly expressed on CD43^{int}IgM⁻B220^{low} pre-B cells, but highly expressed on most immature B220^{high}IgM^{low} and all mature B220^{high}IgM^{high} B cells³⁵. Interestingly, when we fractionated total BM cells into myeloid and lymphoid cell populations, we found that IL-21R α was expressed in total and in lymphoid, but not in myeloid BM cells. This concurs with the inability of IL-21 to stimulate myeloid cells. Unlike IL-21R α , IL-15R α was expressed in both lymphoid and myeloid BM cells. The above observations are agreement with our previous findings, which demonstrated that IL-15, but not IL-21, was a neutrophil (CD11b⁺) agonist. Of note, in the present study, the majority of BM CD11b⁺ cells exhibit a neutrophil phenotype (Fig. 3).

Our results demonstrate that IL-21 exerts its biological activity, namely the capacity to increase mitochondrial activity and to delay apoptosis, in the lymphoid but not myeloid BM cell populations. This is also true for IL-15. However, the myeloid cell population was also induced to proliferate in response to IL-15, albeit with less potency than the lymphoid cell population. Although we did not separate the BM lymphoid cells into different subset populations, our results are in agreement with previous data, demonstrating that IL-21 preferentially acts on lymphoid B cells³⁵. Interestingly, in their study, Jin *et al.* (2004) demonstrated that very few B220⁻ cells in the BM expressed IL-21R³⁵. Knowing that, it is tempting to speculate that IL-21 acts principally on lymphoid B cells subsets; however, this needs further investigation.

To the best of our knowledge, this is the first study to report that IL-21 can itself delay murine BM cell apoptosis. Several studies have reported that IL-21 acts as a coactivator. IL-21 was shown to costimulate human B cell proliferation induced by anti-CD40⁵. In contrast, IL-21 was found to suppress B cell proliferation induced by anti-IgM and IL-4³⁵. Recently, it was reported in mice that IL-21 did not costimulate anti-CD40-induced B cell proliferation, but rather induced apoptosis²⁶. In contrast to human, IL-21 inhibited rather than enhancing the IL-15-induced expansion of resting and activated NK cells^{25,26}. These experiments demonstrate that human and murine IL-21 act differently. Herein, we found that, on its own, IL-21 did not induce BM cell proliferation, but acted as an anti-apoptotic molecule in lymphoid CD11b⁻ cells expressing IL-21R α .

Both IL-15 and IL-21, like many other class I cytokines, are known to activate the Jak-STAT pathway for mediation of their biological actions¹⁻⁴. In particular, IL-21 activates Jak1, Jak3, STAT1, STAT3 and STAT5 in different human T cell and B cell lines and in NK cells¹⁻⁴. In addition to the Jak-STAT pathway, IL-21 was found to activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, since it induced phosphorylation of ERK1/2 (p44/42 MAPK), at least in myeloma cells⁷. Recently, we reported that IL-21 also induced phosphorylation of ERK1/2 in human promyelocytic HL-60 cells expressing IL-21R α , but not in IL-21R α negative neutrophil cells²². IL-15 is particularly known to activate Jak-1/3-STAT3/5 in a variety of cells, including B, T and NK cells^{1,16,36}. In human neutrophils, IL-15 induced phosphorylation of Jak-2, p38 and ERK1/2, but not STAT5³⁷. Although IL-15 is known to activate NF- κ B under several experimental conditions, involvement of this transcription factor in IL-21-activated cells

was not clear prior to the present study. We decided to investigate the role of NF- κ B in IL-15- and IL-21-induced BM cells by using mice deficient in NF- κ Bp50. NF- κ B is composed of homo- and heterodimers of Rel family proteins including p65, RelB, c-Rel, p52 and p50, and targeted disruption of the p50 subunit in mice caused multifocal defects in the immune response³⁸. These mice showed no developmental abnormalities, but, interestingly, their B cells did not proliferate in response to LPS. In another study, NF- κ Bp50 was found to be essential to neutrophil accumulation, elicited by LPS in lungs of NF- κ Bp50^{-/-} mice³⁹. Others have reported that NF- κ Bp50^{-/-} mice were refractory to induction of acute and chronic arthritis, using the methylated BSA/IL-1-induced and collagen-induced arthritis models, respectively⁴⁰. Interestingly, in this same study, the authors found that, in contrast to p50^{-/-} mice, c-rel deficient mice were resistant to collagen induced-arthritis, but not to the other model⁴⁰. In another study, NF- κ Bp50 deficient mice were resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). This resistance to EAE was associated with a deficiency of MOG-specific T cells to differentiate into Th1 or Th2-type effector cells⁴¹.

Herein, although we focused our study on the two pro-inflammatory cytokines IL-15 and IL-21, we used LPS throughout our experiments because of the known importance of NF- κ B in LPS-induced biological actions²⁹⁻³¹. We confirm here the importance of this transcription factor for LPS induced signalling in BM cells, since the ability of LPS to induce mitochondrial activity and proliferation was significantly diminished in NF- κ Bp50 deficient mice. Although several studies have been performed with NF- κ Bp50 KO mice³⁸⁻

⁴¹, this is the first study to investigate the role of cytokines in BM cell proliferation and apoptosis. Unlike IL-15, NF- κ Bp50 is not involved in IL-21-induced BM cell proliferation. In fact, this was highly expected, since IL-21 did not stimulate BM cell proliferation in normal C57BL/6 cells. This is in agreement with previous studies reporting that IL-21 did not activate NF- κ B^{7,7a}. However, we have observed that IL-21 was able to increase moderately mitochondrial activity in NF- κ Bp50 deficient BM cells. This is probably due to an additive effect, obtained from both myeloid and lymphoid cell populations, since IL-21 slightly, but not significantly, increased the MTT assay in a concentration-dependent manner. The MTT assay is known as a good indicator of cell proliferation. However, the test is based on the ability of a mitochondrial dehydrogenase enzyme from viable cells to cleave the tetrazolium rings, leading to the formation of dark blue formazan crystals that are measured by colorimetry⁴². The MTT assay is also recognized as a cell viability assay because of the enzyme activity observed in viable cells. We explain the increase in MTT activity by IL-21 as a consequence of delayed BM cell apoptosis rather than its ability to induce cell proliferation which, indirectly, increases cell viability. Apoptotic cells are considered viable cells, since they exclude trypan blue.

In contrast to IL-21, the role of NF- κ B in IL-15-induced biological activities has been studied previously in a variety of in vitro conditions. For example, using a gel mobility shift assay, NF- κ B was found to be one of the major signal molecules to mediate IL-15-induced cyclo-oxygenase-2 upregulation in rheumatoid synoviocytes⁴³. IL-15 was also found to inhibit spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and NF- κ B activation¹⁷. In addition,

IL-15 has been found to induce NF- κ B activation and IL-8 production in human neutrophils¹⁹. Interestingly, NF- κ B was reported to be activated in human BM and cord blood progenitor cells via constitutive endogenous secreted IL-15 from CD34⁺ cells¹⁶. Despite the above observations, there has been no previous study which investigating the role of NF- κ B in IL-15-stimulated murine BM cells. The use of these mice permitted the definitive demonstration that NF- κ B is an important transcription factor activated by IL-15, but that IL-15 can still mediate its biological activity in BM cells even in the absence of NF- κ Bp50.

Collectively, our results are the first to demonstrate that the two pro-inflammatory cytokines IL-15 and IL-21 can alter murine BM cell physiology. These cytokines preferentially act on BM lymphoid (CD11b⁻) rather than myeloid (CD11b⁺) cell populations. Both cytokines can mediate some biological activities in BM cells isolated from NF- κ Bp50 mice. While BM cells can accumulate in the presence of IL-15 or IL-21, the mechanisms involved are distinct between both cytokines. IL-15 can simultaneously induce cell proliferation and delay apoptosis, whereas IL-21 cannot induce BM cell proliferation, but acts by suppressing BM cell apoptosis. This study provides the first evidence that presence of IL-15 and/or IL-21 in BM can participate in increasing the number of total BM cells, especially of the CD11b⁻ lymphoid phenotype.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

Figure 1

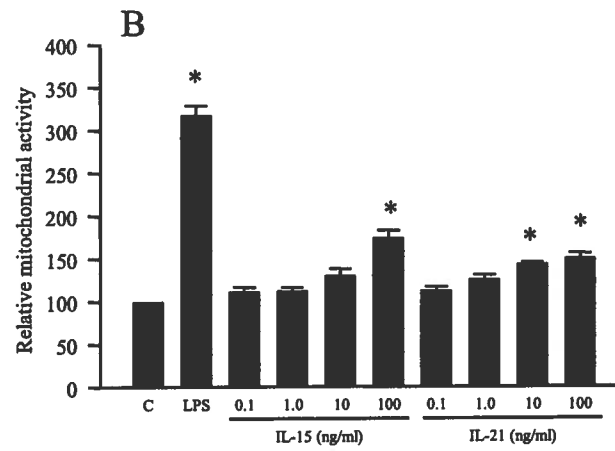
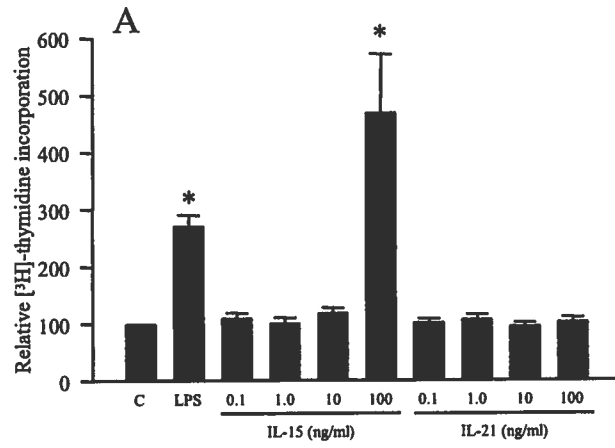


Figure 2

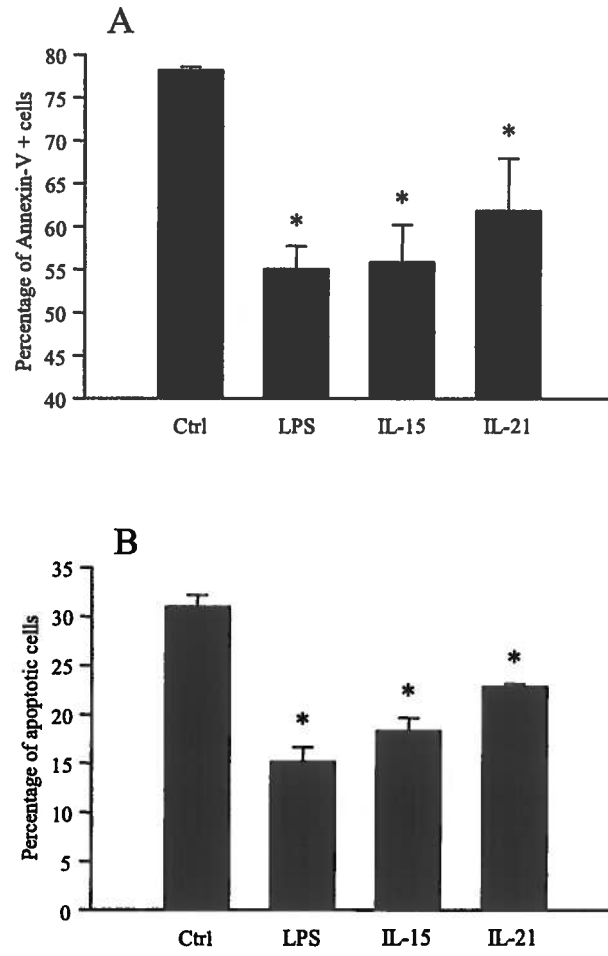


Figure 3

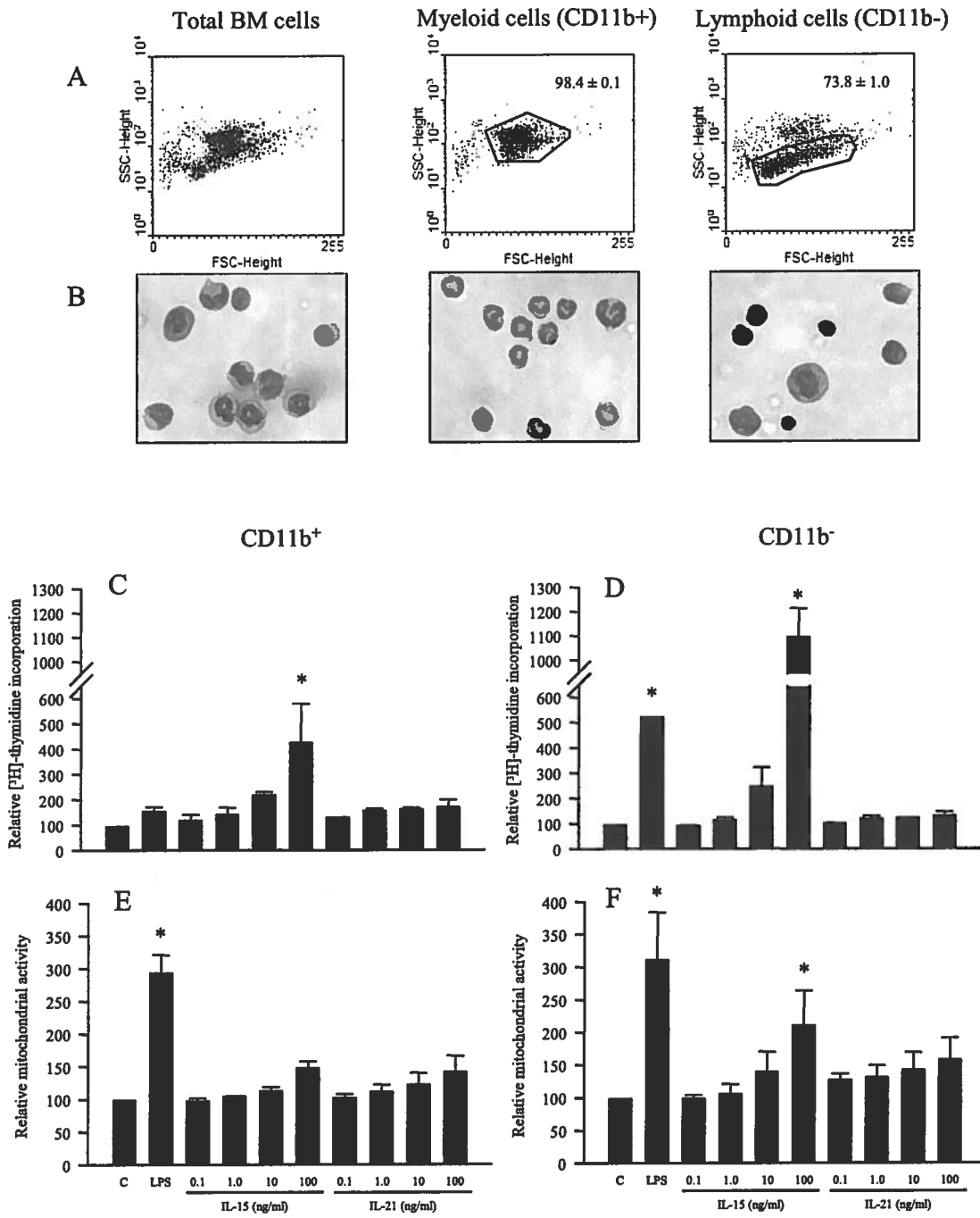


Figure 4

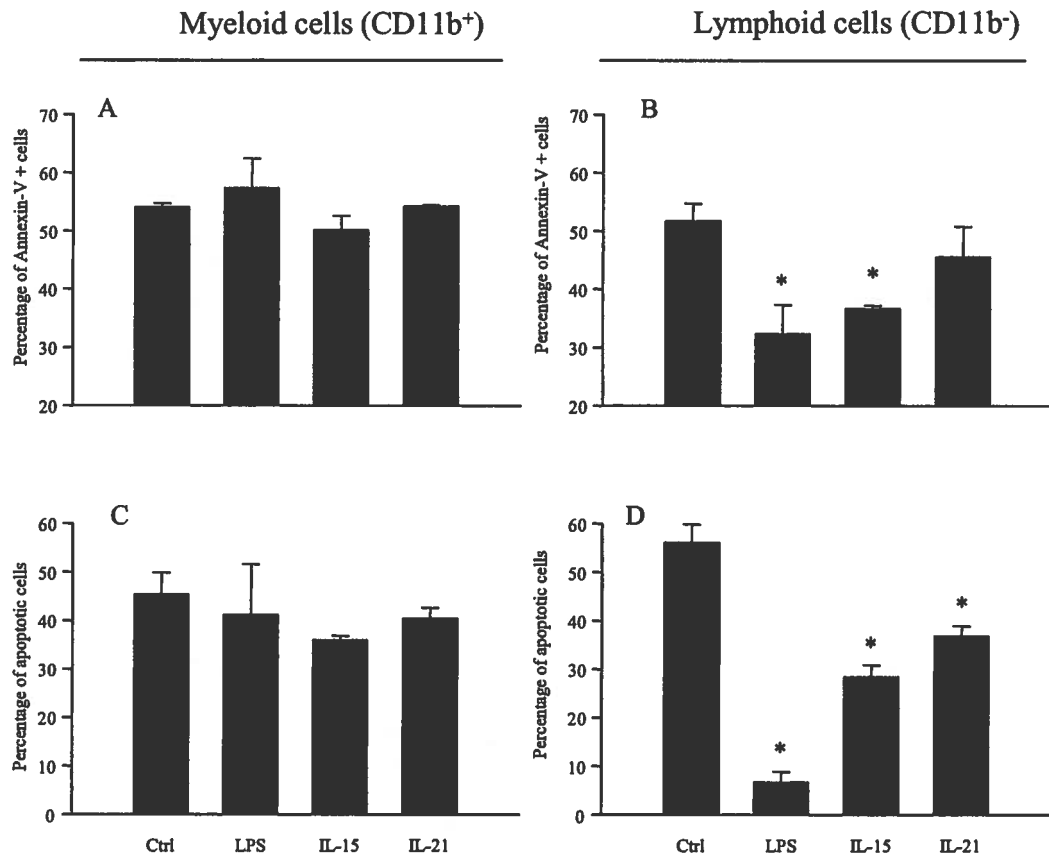


Figure 5

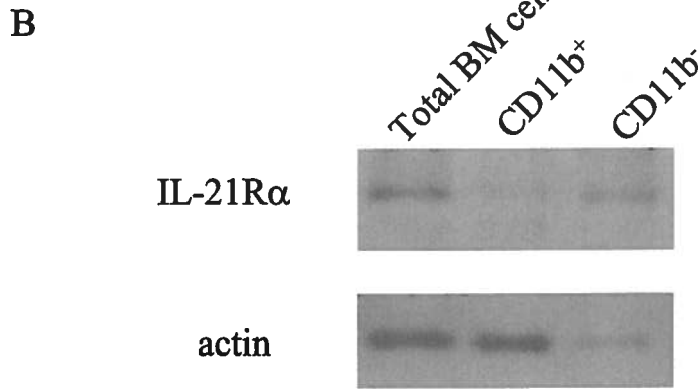
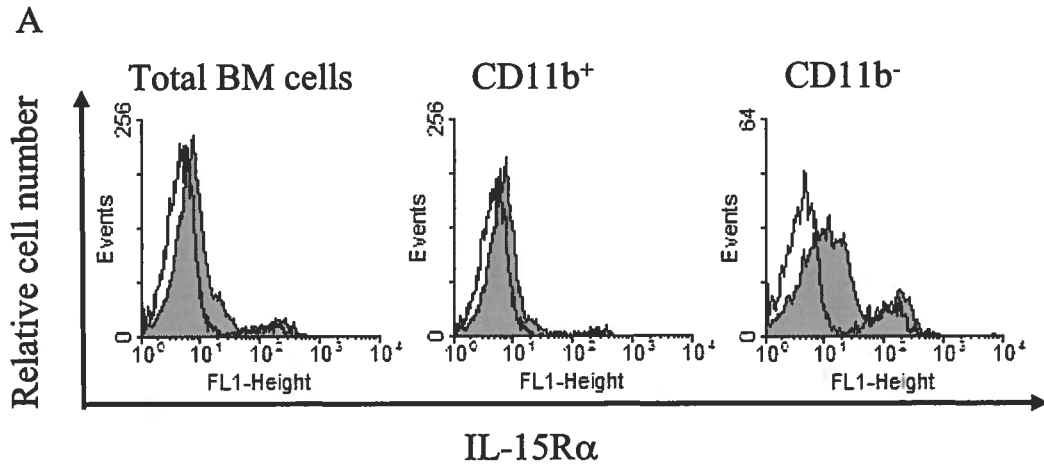


Figure 6

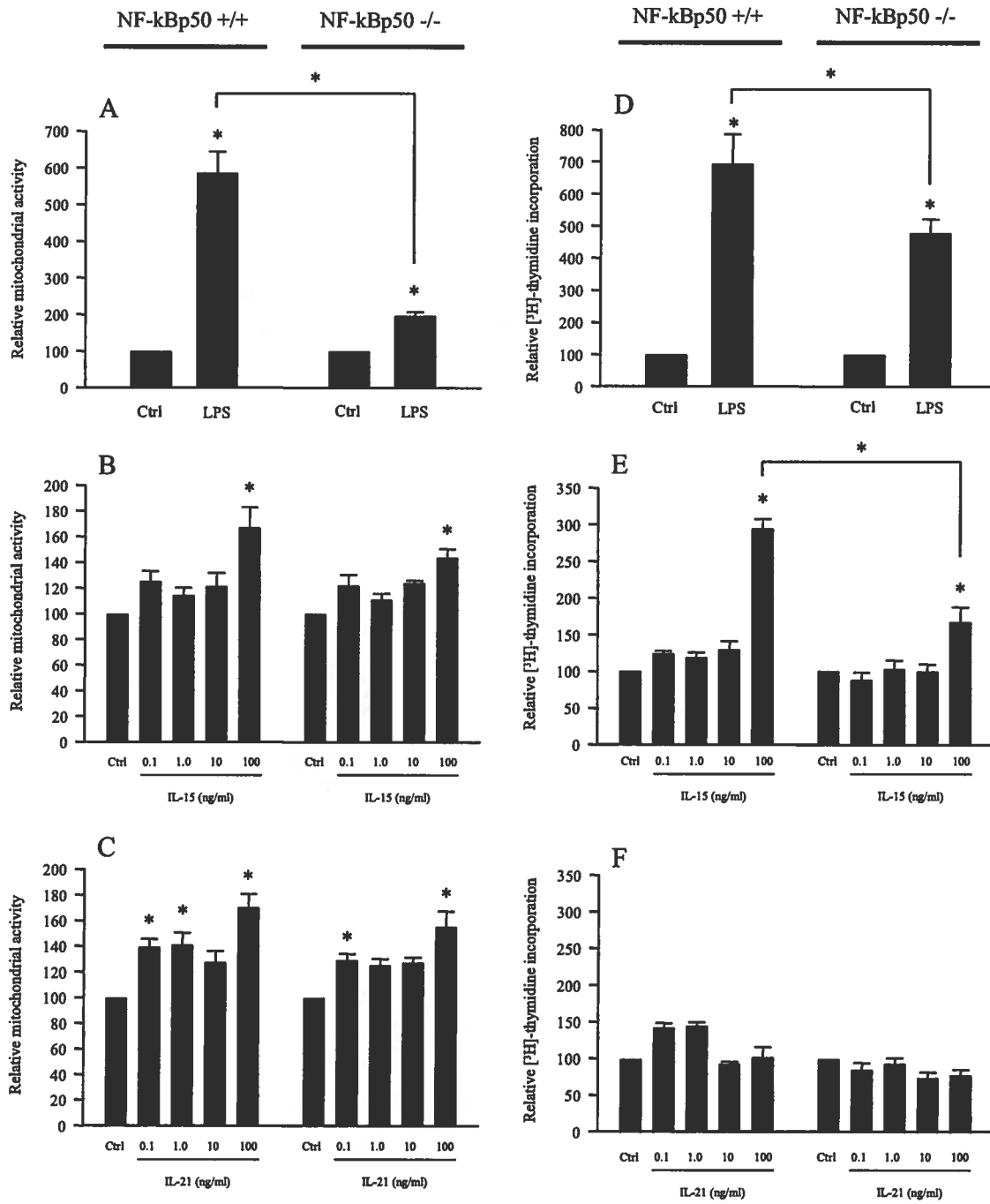
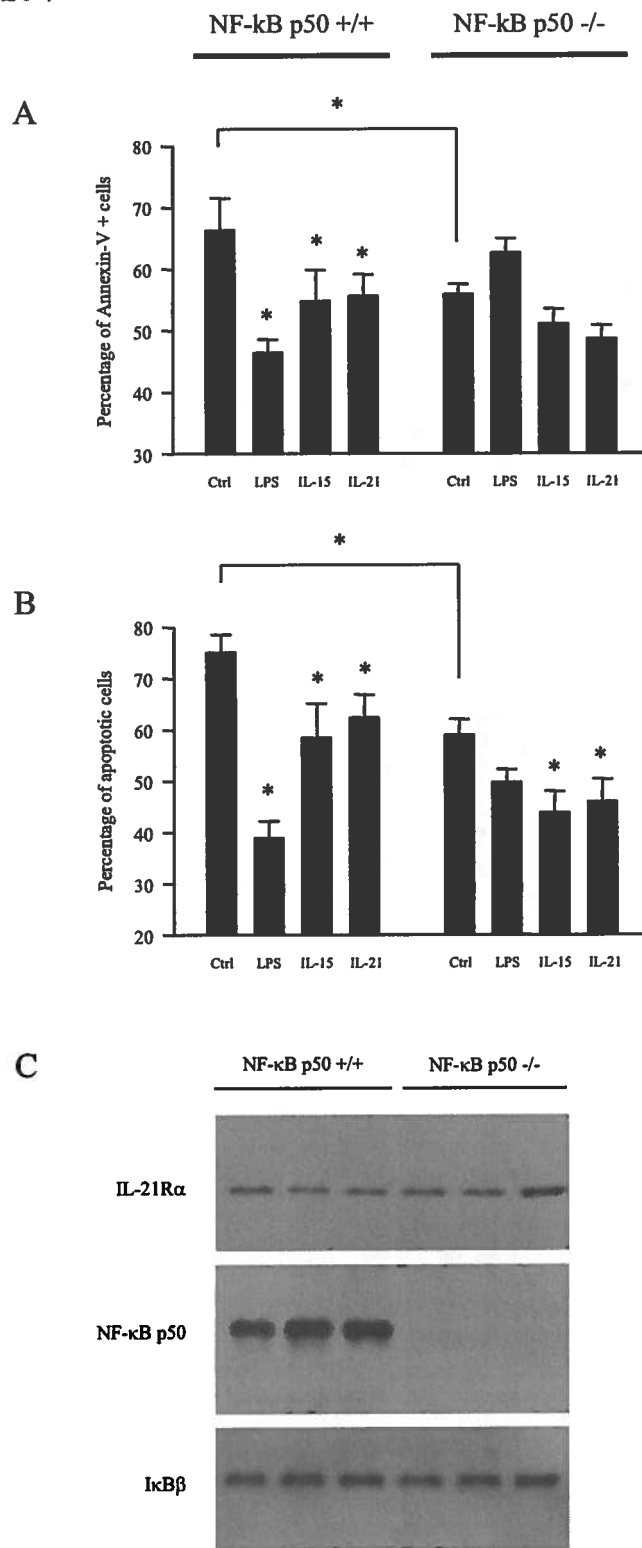


Figure 7



LEGENDS

Figure 1: *Effect of IL-15 and IL-21 on cell proliferation and mitochondrial activity in cultured bone marrow cells.* Bone marrow cells were isolated from C57BL/6 mice femurs and cultured 3 days in RPMI+10% FCS in the presence of buffer (C), 100 ng/ml LPS or an increasing concentration of rmIL-15 or rmIL-21 (0.1-100 ng/ml). Cell proliferation (A) was assessed by [³H]-thymidine incorporation and the mitochondrial activity (B) was evaluated by the MTT assay as described in Materials and Methods. Results are expressed as percentage of the activity of cells exposed to medium alone (control = 100 %), mean ± SEM (n ≥ 6). *, p < 0.05 by ANOVA.

Figure 2: *IL-15 and IL-21 delay apoptosis in cultured bone marrow cells.* Bone marrow cells were isolated and incubated as in legend of **Fig. 1** in the presence of buffer (Ctrl), 100 ng/ml LPS, 100 ng/ml rmIL-15 or 100 ng/ml rmIL-21. The percentage of apoptotic cells (mean ± SEM, n ≥ 4) was evaluated by measuring the number of annexin-V positive cells (A) or sub-diploid (sub-G0/G1) cells from a cell cycle profile (B) as described in Materials and Methods. *, p < 0.05 by ANOVA.

Figure 3: *Activation of bone marrow myeloid (CD11b⁺) and lymphoid (CD11b⁻) cell proliferation by IL-15 and IL-21.* Bone marrow cells were isolated from C57BL/6 mice femurs and myeloid (CD11b⁺) cells were separated from lymphoid (CD11b⁻) cells using magnetic bead separation as described in Materials and Methods. The purity of separation was evaluated by flow cytometry (A) and a representative cytocentrifuged preparation of each fraction is illustrated (B). Cells were incubated for 3 days in RPMI+10% FCS with buffer (Ctrl), 100 ng/ml LPS or 0.1, 1, 10, or 100 ng/ml of IL-15 or IL-21. Cell proliferation (C and D) was assessed by [³H]-thymidine incorporation and the mitochondrial activity (E and F) was evaluated by the MTT assay as described in Materials and Methods. Results are expressed as percentage of the activity of cells exposed to medium alone (control = 100 %), mean ± SEM (n ≥ 3). *, p < 0.05 by ANOVA.

Figure 4: *IL-15 and IL-21 preferentially delay apoptosis in bone marrow lymphoid (CD11b⁻) cells.* Bone marrow cells were isolated from C57BL/6 mice femurs and myeloid cells (CD11b⁺) were separated from lymphoid cells (CD11b⁻) as in legend of Figure 3. Cells were incubated for 3 days in RPMI+10% FCS with buffer (Ctrl), 100 ng/ml of LPS, IL-15 or IL-21. The percentage of apoptotic cells (mean ± SEM, n ≥ 2) was evaluated by measuring the number of annexin-V positive cells (A and B) or sub-diploid (sub-G0/G1) cells from a cell cycle profile (C and D) as described in Materials and Methods. *, p < 0.05 by ANOVA.

Figure 5: *Expression of IL-15R α and IL-21R α receptor components in bone marrow cells.* Bone marrow cells were isolated from C57BL/6 mice femurs and separated into myeloid (CD11b⁺) or lymphoid (CD11b⁻) cells as in legend of Figure 3. Expression of IL-15R α was evaluated by flow cytometry (A) using the anti-mouse IL-15R α antibody (solid histogram). Open histogram, appropriate isotypic control. Expression of IL-21R α was evaluated by western blot (B) using the anti-mouse IL-21R α antibody as described in Materials and Methods. Results are from one representative experiment out of three.

Figure 6: *Involvement of NF- κ B in IL-15-induced bone marrow cell proliferation.* Bone marrow cells were isolated from femurs of mice homozygous for NF- κ B1 mutation (NF- κ Bp50^{-/-}) and their littermate controls (NF- κ Bp50^{+/+}). Cells were incubated for 3 days in RPMI+10% FCS with buffer (Ctrl), 100 ng/ml LPS (A,D) or a concentration of 0.1, 1, 10, or 100 ng/ml of IL-15 (B,E) or IL-21 (C,F). Mitochondrial activity (A,B,C) was evaluated by the MTT assay and cell proliferation (D,E,F) was assessed by [³H]-thymidine incorporation as described in Materials and Methods. Results are expressed as percentage of the activity of cells exposed to medium alone (control = 100 %), mean \pm SEM (n=5). *, p < 0.05 by ANOVA.

Figure 7. Involvement of NF- κ B in IL-15 and IL-21-induced suppression of bone marrow cell apoptosis. Bone marrow cells were isolated from femurs of mice homozygous for NF- κ B1 mutation (NF- κ Bp50^{-/-}) and their littermate controls (NF- κ Bp50^{+/+}). Cells were incubated for 3 days in RPMI+10% FCS with buffer (Ctrl), 100 ng/ml of LPS, IL-15 or IL-21. The percentage of apoptotic cells (mean \pm SEM, n =5) was evaluated by measuring the number of annexin-V positive cells (A) or sub-diploid (sub-G0/G1) cells from a cell cycle profile (B) as described in Materials and Methods. *, p < 0.05 by ANOVA. Expression of IL-21R α in WT and KO mice was studied by western blot (C). The absence of NF- κ Bp50 was confirmed in KO mice by western blot and expression of I κ B β was studied in parallel and was used as a control for protein loading. Results are from three different animals randomly selected in both groups.

REFERENCES

1. Kovanen PE, Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev.* 2004; 202: 67-83.
2. Vosshenrich CA, Di Santo JP. Cytokines: IL-21 joins the gamma(c)-dependent network? *Curr Biol.* 2001; 11: R175-R177.
3. Asao H, Okuyama C, Kumaki S *et al.* Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol.* 2001; 167: 1-5.
4. Nakajima H, Noguchi M, Leonard WJ. Role of the common cytokine receptor gamma chain (gamma c) in thymocyte selection. *Immunol Today.* 2000; 21: 88-94.
5. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A *et al.* Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function . *Nature* 2000; 408: 57-63.
6. Sivori S, Cantoni C, Parolini S *et al.* IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 3439-3447.

7. Brenne AT, Baade Ro T, Waage A, Sundan A, Borset M, Hjorth-Hansen H. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. *Blood* 2002; 99: 3756-3762.
- 7a. Suto A, Nakajima H, Hirose K *et al.* Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C ϵ transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood*. 2002; 100: 4565-4573.
8. Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol.* 2005; 86: 209-239.
9. McInnes IB, Gracie JA. Targeting cytokines beyond tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2004; 6: 336-342.
10. Lodolce J, Burkett P, Koka R *et al.* Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis. *Mol Immunol.* 2002; 39: 537-544.
11. Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE *et al.* Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med.* 2005; 201: 139-148.
12. Wang G, Tschoi M, Spolski R *et al.* In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 9016-9022.

13. Ozdemir O, Ravindranath Y, Savasan S. Mechanisms of superior anti-tumor cytotoxic response of interleukin 15-induced lymphokine-activated killer cells. *J Immunother.* 2005; 28: 44-52.
14. Kobayashi H, Dubois S, Sato N *et al.* Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood.* 2005; 105: 721-727.
15. Strengell M, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells. *J Leukoc Biol.* 2004; 76: 416-422.
16. Giron-Michel J, Caignard A, Fogli M *et al.* Differential STAT3, STAT5, and NF-kappaB activation in human hematopoietic progenitors by endogenous interleukin-15: implications in the expression of functional molecules. *Blood.* 2003; 102: 109-117.
17. Hoontrakoon R, Chu HW, Gardai SJ *et al.* Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26: 404-412.
18. Bulfone-Paus S, Bulanova E, Pohl T *et al.* Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain. *FASEB J.* 1999; 13: 1575-1585.

19. McDonald PP, Russo MP, Ferrini S, Cassatella MA. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood*. 1998; 92: 4828-4835.

20. Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol*. 2002; 72: 856-863.

21. Di Carlo E, Comes A, Orengo AM *et al*. IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN-gamma-dependent CXC chemokines in syngeneic mice. *J Immunol*. 2004; 172: 1540-1547.

22. Pelletier M, Bouchard A, Girard D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol*. 2004; 173: 7521-7530.

23. Pelletier M, Girard D. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin Exp. Immunol*. 2005; 141: 315-325.

24. Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T *et al*. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat Med*. 1997; 3: 1124-1128.

25. Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL *et al*. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity*. 2002; 16: 559-569.

26. Mehta DS, Wurster AL, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *J Immunol.* 2003; 170: 4111-4118.
27. Sandau MM, Schluns KS, Lefrancois L, Jameson SC. Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells. *J Immunol.* 2004; 173: 6537-6541.
28. Barao I, Hudig D, Ascensao JL. IL-15-mediated induction of LFA-1 is a late step required for cytotoxic differentiation of human NK cells from CD34+Lin- bone marrow cells. *J Immunol.* 2003; 171: 683-690.
29. Bannerman DD, Eiting KT, Winn RK, Harlan JM. FLICE-like inhibitory protein (FLIP) protects against apoptosis and suppresses NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1423-1431.
30. Cameron P, McGachy A, Anderson M *et al.* Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol.* 2004; 173: 3297-3304.
31. Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.* 2000; 6: 453-457.

32. Lodolce JP, Boone DL, Chai S *et al.* IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998; 9: 669-676.
33. Ueda M, Imada K, Imura A, Koga H, Hishizawa M, Uchiyama T. Expression of functional interleukin-21 receptor on adult T-cell leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2005; 128: 169-176.
34. Brandt K, Bulfone-Paus S, Foster DC, Ruckert R. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood.* 2003; 102: 4090-4098.
35. Jin H, Carrio R, Yu A, Malek TR. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J Immunol.* 2004;173: 657-665.
36. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 8705-8709.
37. Pelletier M, Ratthe C, Girard D. 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.* 2002; 532: 164-170.

38. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*. 1995; 80: 321-330.
39. Mizgerd JP, Lupa MM, Spieker MS. NF-kappaB p50 facilitates neutrophil accumulation during LPS-induced pulmonary inflammation. *BMC Immunol*. 2004; 5: 1-11.
40. Campbell IK, Gerondakis S, O'Donnell K, Wicks IP. Distinct roles for the NF-kappaB1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. *J Clin Invest*. 2000;105: 1799-1806.
41. Hilliard B, Samoilova EB, Liu TS, Rostami A, Chen Y. Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol*. 1999; 163: 2937-2943.
42. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
43. Min SY, Hwang SY, Jung YO, Jeong J, Park SH, Cho CS, Kim HY, Kim WU. Increase of cyclooxygenase-2 expression by interleukin 15 in rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol*. 2004; 31: 875-883.

Chapitre 8 : Discussion et conclusion

Le but de ce travail était d'évaluer *in vitro* et *in vivo* les effets potentiellement pro-inflammatoires de l'IL-15 et de l'IL-21 ainsi que leurs implications respectives dans la régulation des fonctions des neutrophiles. La caractérisation des interactions entre les neutrophiles, l'IL-15 et l'IL-21 permettra de mieux comprendre leurs rôles dans des contextes particuliers de maladies inflammatoires.

Interactions neutrophiles/IL-15

Les macrophages et fibroblastes synoviaux sont responsables de la production de niveaux élevés d'IL-15 retrouvés dans les fluides biologiques de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Klimiuk *et al.*, 1999; Sen *et al.*, 2000). Ces mêmes fluides biologiques contiennent une quantité élevée de neutrophiles, cellules majoritairement responsables de la destruction des tissus au site d'inflammation (Edwards et Hallett, 1997). Nous avons donc utilisé le modèle murin de la poche d'air, un modèle inflammatoire morphologiquement similaire à la membrane synoviale (Edwards *et al.*, 1981), afin de vérifier si l'IL-15 était impliqué dans le recrutement des neutrophiles. Nous montrons que l'IL-15 induit le recrutement massif de leucocytes, en grande partie des neutrophiles (environ 70% des cellules totales), au site inflammatoire (Figures 5 et 6/Article III). Il est fort probable que les mécanismes impliqués dans le recrutement des neutrophiles par l'IL-15 dans le modèle murin de la poche d'air soient de nature indirecte. En effet, il a été montré que l'IL-15 n'a aucun effet chimiotactique direct sur les neutrophiles, mais qu'elle peut néanmoins potentialiser la migration des neutrophiles envers le fMLP et le CXCL8/IL-8 (Mastroianni *et al.*, 2000). Il est donc envisageable que l'IL-15 puisse agir en induisant la production de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires possédant des propriétés chimiotactiques. En effet, il a été montré que l'IL-15 stimule la sécrétion de CXCL8/IL-8 par les neutrophiles (McDonald *et al.*, 1998b) et la sécrétion de CXCL8/IL-8 et CCL2/MCP-1 par les monocytes (Badolato *et al.*, 1997). CXCL8/IL-8, un puissant chimioattractant des neutrophiles, n'est toutefois pas retrouvé chez la souris, mais on y retrouve tout de même un homologue de la forme humaine, le CXCL2/MIP-2 (Widmer *et al.*, 1993). Une étude a récemment montré qu'une toxine de *Streptococcus pneumoniae* induit le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires de la souris

par un mécanisme impliquant l'IL-6 et le CXCL2/MIP-2 (Rijneveld *et al.*, 2002). Par ailleurs, les fibroblastes synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde expriment des niveaux élevés d'IL-6, de CXCL8/IL-8 et d'IL-15 (Sen *et al.*, 2000). Nous avons donc vérifié les niveaux d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2 dans les exsudats provenant du lavage de la poche d'air et nous montrons que leur expression est corrélée avec l'augmentation du nombre de neutrophiles induit par l'IL-15 (Figure 7/Article III). La présence simultanée de neutrophiles, d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2 a également été observée dans les exsudats provenant du lavage de la poche d'air de souris stimulées avec de l'hémozoïne, un métabolite de l'hème converti en cristal insoluble par *Plasmodium falciparum*, le parasite responsable de la malaria, lors de la dégradation de l'hémoglobine (Jaramillo *et al.*, 2004). Ces facteurs chimiotactiques pourraient être synthétisés par les cellules résidentes de la poche d'air ou encore par les neutrophiles eux-mêmes. En effet, il a été montré que les neutrophiles contiennent une réserve intracellulaire de CXCL2/MIP-2 qui peut être rapidement mobilisée lors de l'activation des cellules (Matzer *et al.*, 2001). Il a également été montré que les neutrophiles produisent de l'IL-6 suite à la liaison de CD44 (Sconocchia *et al.*, 2001). Il serait donc intéressant de déterminer si ce sont les neutrophiles eux-mêmes ou les cellules résidentes de la poche (fibroblastes ou macrophages synoviaux) qui sont responsables de la production locale d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2.

Il est possible qu'un médiateur soit impliqué dans le recrutement de neutrophiles induit par l'IL-15 en augmentant la production d'IL-6 et CXCL2/MIP-2 par les cellules présentes dans la poche. Une étude a récemment montré que l'IL-17 est impliquée dans le recrutement de neutrophiles dans les voies respiratoires de la souris exposées à une endotoxine. En effet, l'endotoxine induit la production d'IL-17 qui provoque à son tour la production d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2, tous deux responsables d'attirer les neutrophiles au site d'inflammation (Miyamoto *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que l'IL-15 est responsable de la production d'IL-17 par les cellules mononucléées du fluide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Ziolkowska *et al.*, 2000). L'IL-17 induit à son tour la production d'IL-6 et de CXCL8/IL-8 par les fibroblastes synoviaux (Hwang *et al.*, 2004). Tel que mentionné précédemment, le modèle murin de la poche d'air implique le

développement d'une mince couche de tissus composée de fibroblastes et de macrophages morphologiquement similaire à la membrane synoviale (Edwards *et al.*, 1981). Il est donc possible d'envisager que l'injection d'IL-15 dans le modèle de la poche d'air augmente la production d'IL-17 par les macrophages tapissant la poche qui stimule, à son tour, la production d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2 par les fibroblastes. Étant donné que l'IL-6 et CXCL2/MIP-2 augmentent le recrutement des neutrophiles ainsi que leur potentiel cytotoxique en stimulant, entre autre, la dégranulation d'élastase (Johnson *et al.*, 1998; Call *et al.*, 2001), ces deux médiateurs constituent une cible thérapeutique potentielle visant à éliminer l'accumulation exagérée de neutrophiles activés dans diverses maladies inflammatoires. Une schématisation du mécanisme potentiel impliqué dans le recrutement des neutrophiles induit par l'IL-15 dans le modèle de la poche d'air est représentée par la **figure 9**.

Les neutrophiles qui persistent au site inflammatoire sont grandement responsables de la destruction tissulaire observée dans différentes maladies (Edwards et Hallett, 1997). Plusieurs équipes ont montré que l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des neutrophiles est associée à diverses pathologies. En effet, l'exposition des neutrophiles au pigment malarique augmente l'expression de CD11b/CD18 (Mac-1) et leur adhésion aux tissus, ce qui entraîne un œdème local (Pichyangkul *et al.*, 1997). De plus, lors des premières étapes de la pancréatite aiguë chez le rat, il a été montré que l'infiltration et l'accumulation de neutrophiles dans le pancréas était dépendante de CD11b (Hac *et al.*, 2004). Nous avons observé que l'IL-15 augmente l'expression de CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles (Figure 1/Article III) ainsi que l'expression de CD54 (ICAM-1) à la surface des cellules épithéliales pulmonaires A549 (Figure 2/Article III). De plus l'augmentation de l'adhésion entre ces deux types cellulaires (Figure 3/Article III) suggère que l'IL-15 joue un rôle important dans la séquestration des neutrophiles au site inflammatoire. Il a récemment été montré que la stimulation avec du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IFN- γ de la lignée épithéliale A549 et des cellules épithéliales humaines fraîchement isolées des bronches augmente leur synthèse et/ou leur sécrétion d'IL-15 (Stoek *et al.*, 1998; Stoek *et al.*, 2000; Ge *et al.*, 2004). Ceci indique que les cellules épithéliales peuvent sécréter de l'IL-15 dans le contexte

d'une maladie inflammatoire, ce qui va augmenter le recrutement et l'adhésion des neutrophiles par un mécanisme impliquant la régulation des molécules d'adhésion.

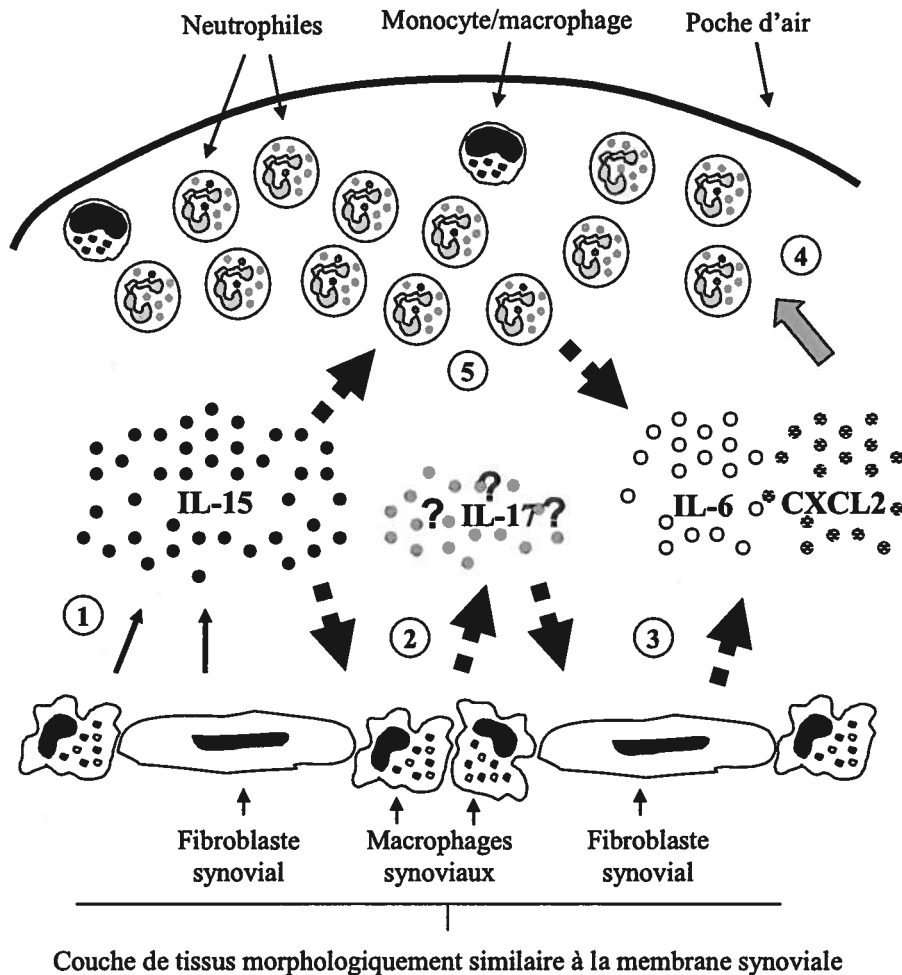


Figure 9 : Mode d'action potentiel du recrutement des neutrophiles induit par l'IL-15 dans le modèle de la poche d'air. Le modèle murin de la poche d'air implique le développement d'une mince couche de tissus, composée de fibroblastes et de macrophages, morphologiquement similaire à la membrane synoviale. L'IL-15 est injectée dans la cavité créée par l'injection d'air. Chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, ce sont les macrophages et les fibroblastes synoviaux qui sont responsables de la production de niveaux élevés d'IL-15 retrouvés dans les fluides biologiques (1). Il est possible que l'IL-15 soit responsable de la sécrétion d'un intermédiaire, comme par exemple l'IL-17, par les cellules mononucléées. La présence d'IL-17 n'a toutefois pas été confirmée dans le modèle de la poche d'air (2). L'IL-17 pourrait induire à son tour la production d'IL-6 et de CXCL8/IL-8 par les cellules résidentes de la poche, possiblement les fibroblastes synoviaux (3). L'IL-6 et le CXCL2/MIP-2 stimulent alors le recrutement des neutrophiles (4). Il est également possible que l'IL-15 stimule directement la sécrétion d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2 par les neutrophiles eux-mêmes (5). → : a été démontré ; ⇨ : doit être confirmé dans le modèle de la poche d'air.

Les molécules d'adhésion CD11b et CD18 sont localisées tant au niveau de la membrane cellulaire que dans les granules secondaires des neutrophiles. Suite à l'activation des cellules, CD11b et CD18 se retrouvent majoritairement à la membrane (Vedder et Harlan, 1988; Lacal *et al.*, 1988). Il a été montré que l'activation des neutrophiles par différents agonistes, comme le PMA et le fMLP, augmente l'avidité de CD11/CD18 (Wright et Meyer, 1986; Lo *et al.*, 1989). Une augmentation de l'avidité se définit comme l'augmentation de la liaison multivalente qui peut être induite par une oligomérisation (*clustering*) des intégrines. L'affinité d'une intégrine, au contraire, se définit comme la force d'interaction entre un site monovalent d'intégrine et son ligand. Il a été suggéré qu'à l'état de repos, la portion extracellulaire d'une intégrine est repliée avec la « tête » de l'intégrine près de la membrane. Suite à l'activation, les portions juxta-membranaires des sous-unités se déplacent, ce qui amène la « tête » de l'intégrine à se redresser et à exposer de nouveaux épitopes (Takagi et Springer, 2002). Lorsqu'une intégrine se lie à son ligand, elle s'oligomérisse et recrute différents adaptateurs et kinases cytoplasmiques qui vont transmettre le signal intracellulaire puisque les intégrines ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque (Giancotti et Ruoslahti, 1999). Il a été montré que la phosphorylation de la kinase Syk induit son association à CD18 dans les neutrophiles. Ceci entraîne une augmentation de la chimiotaxie, une diminution de l'oligomérisation des intégrines et de leur avidité, ainsi qu'une diminution de l'adhésion des neutrophiles. La kinase Syk joue donc un rôle dans la dissociation des intégrines de leurs ligands (Willeke *et al.*, 2003). Comme il a été montré que l'IL-15 induit l'activation de Syk et son association physique à l'IL-15R α dans les neutrophiles (Ratthe et Girard, 2004) et que nous observons une augmentation de l'expression de CD11b/CD18 et de leur adhésion suite à leur stimulation avec l'IL-15 (Figures 2 et 3/Article III), il est possible de spéculer que l'association de l'IL-15R α à la kinase Syk empêche sa liaison à CD18, ce qui permet d'augmenter l'adhésion des neutrophiles ainsi que l'avidité des intégrines. Nous ne pouvons toutefois pas exclure la possibilité que l'IL-15 augmente aussi l'affinité, puisque l'adhésion aux cellules A549 pourrait également être le résultat d'un changement de conformation des intégrines. Il a également été montré que l'oligomérisation de CD11b/CD18 active les neutrophiles en induisant la dégradation de I κ B α et en augmentant la liaison à l'ADN du facteur de transcription NF- κ B (Kim *et al.*, 2004). Il a été montré que l'IL-15 active

NF- κ B (McDonald *et al.*, 1998b), il est donc possible que ce facteur de transcription soit l'une des molécules activées par l'augmentation de l'expression de CD11b/CD18 (et possiblement de leur oligomérisation) induite par l'IL-15. Des expériences supplémentaires seraient donc nécessaires afin de déterminer avec précision les effets de l'IL-15 sur l'affinité et l'avidité de CD11b/CD18 ainsi que le rôle exact de la kinase Syk dans l'adhésion des neutrophiles induite par l'IL-15.

Les neutrophiles ayant adhéré suite à leur activation par l'IL-15 vont persister au site inflammatoire, puisqu'il a été montré que cette cytokine retarde leur apoptose spontanée (Girard *et al.*, 1996; Mastroianni *et al.*, 2000; Ottonello *et al.*, 2002b). Au moment d'entreprendre cette étude, les mécanismes impliqués dans le retard d'apoptose des neutrophiles par l'IL-15 n'étaient pas connus. Nous avons donc comparé les voies de signalisation activées par l'IL-15 et par le GM-CSF, un agoniste bien caractérisé des neutrophiles. Il a été montré précédemment que l'IL-15 et le GM-CSF augmentent la synthèse protéique *de novo* dans les neutrophiles (Edwards *et al.*, 1989; Girard *et al.*, 1996). Nous avons donc vérifié si l'IL-15, tout comme le GM-CSF, augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, molécule impliquée dans la survie des neutrophiles et seul membre de la famille de Bcl-2 clairement détecté au niveau protéique par différentes équipes (Moulding *et al.*, 1998; Epling-Burnette *et al.*, 2001b; Derouet *et al.*, 2004). Nous montrons que l'IL-15 et le GM-CSF retardent effectivement l'apoptose des neutrophiles en régulant l'expression de Mcl-1 (Figure 1/Article II). Des études effectuées dans notre laboratoire ont récemment montré que la pré-incubation des neutrophiles avec la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, inhibe la régulation de Mcl-1 par l'IL-15 et le GM-CSF (Bouchard *et al.*, 2004). Comme il a été montré que Mcl-1 possède une courte demie-vie et que son potentiel de renouvellement est rapide, il est essentiel que les agonistes qui retardent l'apoptose des neutrophiles maintiennent un niveau d'expression constant de cette protéine. À l'inverse de l'IL-15 et du GM-CSF, la VAA-I inhibe l'expression de Mcl-1. Étant donné que cette lectine inhibe la synthèse protéique *de novo* (Savoie *et al.*, 2000), la VAA-I empêche, tout comme la cycloheximide, la régulation de l'expression de Mcl-1, ce qui entraîne ultimement l'apoptose des neutrophiles.

Nous montrons également que, tout comme le GM-CSF, l'IL-15 induit la phosphorylation de Jak-2 (Figure 4/Article II) et que cette kinase est impliquée dans le retard d'apoptose induit par l'IL-15 (Figure 2/Article II). L'activation de Jak-2 ne semble toutefois pas restreinte à l'IL-15 et au GM-CSF. En effet, nous avons observé que l'IL-4, molécule qui retarde également l'apoptose des neutrophiles, est capable d'induire la phosphorylation de Jak-2 (Figure 12/Annexe). L'importance de Jak-2 dans la signalisation anti-apoptotique a également été étudiée dans un autre type de granulocytes, l'éosinophile (Simon *et al.*, 1997; Mücke *et al.*, 1999). D'autres études ont également montré l'importance de la voie de signalisation Jak-STAT dans le retard d'apoptose des neutrophiles induit par le GM-CSF (Epling-Burnette *et al.*, 2001b; Sakamoto *et al.*, 2003). Toutefois, contrairement au GM-CSF, l'IL-15 n'induit pas la phosphorylation de STAT5 (Figure 7/Article II). Malgré le fait que l'IL-15 et le GM-CSF soient tous deux impliqués dans le retard de l'apoptose des neutrophiles, nos résultats indiquent que leur mode d'action n'implique pas les mêmes voies de signalisation. Epling-Burnette et ses collaborateurs (2001) ont montré que l'activation de la voie de signalisation Jak-STAT par le GM-CSF est directement liée à l'augmentation de l'expression de Mcl-1 (Epling-Burnette *et al.*, 2001b). L'analyse du promoteur du gène codant pour Mcl-1 a révélé la présence de sites de liaison potentiels pour les facteurs de transcription NF- κ B, STAT, SRE (*steroid response element*), Ets (*erythroblast transformation specific*), Spl (*specificity protein 1*) et CRE-BP (*cyclic AMP response element-binding protein*) (Akgul *et al.*, 2000). Comme il a été montré que l'IL-15 augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B dans les neutrophiles (McDonald *et al.*, 1998b), il est possible que ce facteur de transcription soit impliqué dans l'augmentation de l'expression de Mcl-1. Un autre facteur de transcription possiblement impliqué dans la régulation de Mcl-1 est STAT3. En effet, il a été montré que la forme activée de STAT3 se lie au promoteur du gène codant pour Mcl-1 et que l'activité transcriptionnelle de STAT3 augmente le niveau endogène de Mcl-1 (Epling-Burnette *et al.*, 2001a). De plus, il a été montré que la phosphorylation sur résidus sérine de STAT3 est essentielle pour l'expression de Mcl-1 et la survie des macrophages (Liu *et al.*, 2003). Par ailleurs, des résultats préliminaires provenant du laboratoire suggèrent que l'IL-15 augmente la phosphorylation de STAT3 (observations non publiées). Ceci indique

que la voie de signalisation Jak-STAT, très probablement les membres Jak-2 et STAT3, joue un rôle essentiel dans la survie des neutrophiles, possiblement en modulant l'expression des protéines anti-apoptotiques comme Mcl-1. Des études sur la phosphorylation possible des autres membres de la voie de signalisation Jak-STAT par l'IL-15 sont présentement en cours dans le laboratoire et permettront de mieux caractériser les Jak et les STAT impliqués dans l'induction du retard d'apoptose des neutrophiles et leurs rôles dans l'augmentation de l'expression de Mcl-1.

Dans cette étude, nous montrons aussi que, tout comme le GM-CSF, l'IL-15 induit la phosphorylation de deux membres de la voie de signalisation des MAP kinases, ERK1/2 et p38, dans les neutrophiles (Figures 5 et 6/Article II). De plus, nous montrons que ces deux voies de signalisation sont impliquées dans l'induction du retard d'apoptose par l'IL-15 (Figure 2/Article II). Il a été montré que l'activation de ERK1/2 joue un rôle important dans le retard d'apoptose et la survie des neutrophiles (Klein *et al.*, 2000; Jozsef *et al.*, 2004; Khreiss *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005). Les diverses études sur l'implication de p38 MAPK dans l'apoptose sont toutefois contradictoires. Certaines équipes suggèrent que la signalisation par p38 MAPK induit des signaux de survie dans les neutrophiles, alors que d'autres équipes affirment que l'activation de cette voie de signalisation serait essentielle pour l'apoptose (spontanée et/ou induite) (Frasch *et al.*, 1998; Aoshiba *et al.*, 1999; Villunger *et al.*, 2000; Alvarado-Kristensson *et al.*, 2002; Larbi *et al.*, 2005; Salanova *et al.*, 2005). Suzuki et ses collaborateurs (2001) ont récemment montré que lors de l'apoptose des neutrophiles, il y a diminution de la phosphorylation puis clivage de ERK1/2 et de p38 MAPK par un mécanisme dépendant des caspases. Ce phénomène serait, en partie, responsable de la perte de l'activité des neutrophiles en réponse aux cytokines inflammatoires (Suzuki *et al.*, 2001). Nos résultats sont donc en accord avec les équipes suggérant que l'activation des kinases ERK1/2 et p38 joue un rôle dans l'induction du retard de l'apoptose. Alvarado-Kristensson et ses collaborateurs (2004) ont récemment montré que la signalisation par p38 MAPK retarde l'apoptose des neutrophiles humains en induisant la phosphorylation de la caspase-3 et de la caspase-8, ce qui inhibe leur activité (Alvarado-Kristensson *et al.*, 2004). Ainsi, comme il a été suggéré que l'IL-15 diminue l'activité de ces deux caspases dans les neutrophiles

(Ottonello *et al.*, 2002b; Bouchard *et al.*, 2004), il est possible d'envisager que l'IL-15 pourrait induire leur phosphorylation suite à l'activation de p38 MAPK. Une autre étude a montré que ERK1/2 peut phosphoryler et inhiber la caspase-9 (Allan *et al.*, 2003), une caspase jouant un rôle dans l'apoptose des neutrophiles (Maiani *et al.*, 2004; Taneja *et al.*, 2004). Nous pouvons supposer que l'IL-15 pourrait également augmenter la phosphorylation de cette caspase dans les neutrophiles. Des études supplémentaires sont donc requises pour démontrer si l'activation par l'IL-15 de ERK1/2 et p38 MAPK retarde l'apoptose des neutrophiles en phosphorylant directement des caspases afin de diminuer leur activité enzymatique. En résumé, nous montrons que la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et les kinases Jak-2, ERK1/2 et p38 MAPK, mais non la voie de signalisation impliquant les protéines G, participent au retard de l'apoptose des neutrophiles induit par l'IL-15. Une schématisation du modèle potentiel des différentes voies de signalisation activées par l'IL-15 dans les neutrophiles est représentée par la **figure 10**.

La lectine de plante VAA-I possède des propriétés qui présentent un potentiel thérapeutique. En effet, la VAA-I est utilisée comme adjuvant pour le traitement de différents types de cancers (Kovacs *et al.*, 1991; Gorter *et al.*, 1998; Kovacs, 2000). À faibles concentrations, la VAA-I est immunostimulatrice alors qu'à des concentrations élevées, elle possède des effets inhibiteurs sur différentes cellules du système immunitaire (Menges *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que cette molécule module les réponses des neutrophiles (Savoie *et al.*, 2000). La VAA-I offre donc une stratégie thérapeutique intéressante puisqu'elle pourrait favoriser les réponses des neutrophiles, comme dans le contexte de l'immunité anti-tumorale, ou encore les éliminer dans diverses maladies inflammatoires. Dans le deuxième volet de cette recherche, nous avons tenté de mieux comprendre le mode d'action de la VAA-I. Nous avons également vérifié si cette lectine pouvait moduler les réponses induites par l'IL-15 des neutrophiles humains, plus particulièrement la phagocytose, l'apoptose et la synthèse protéique *de novo*.

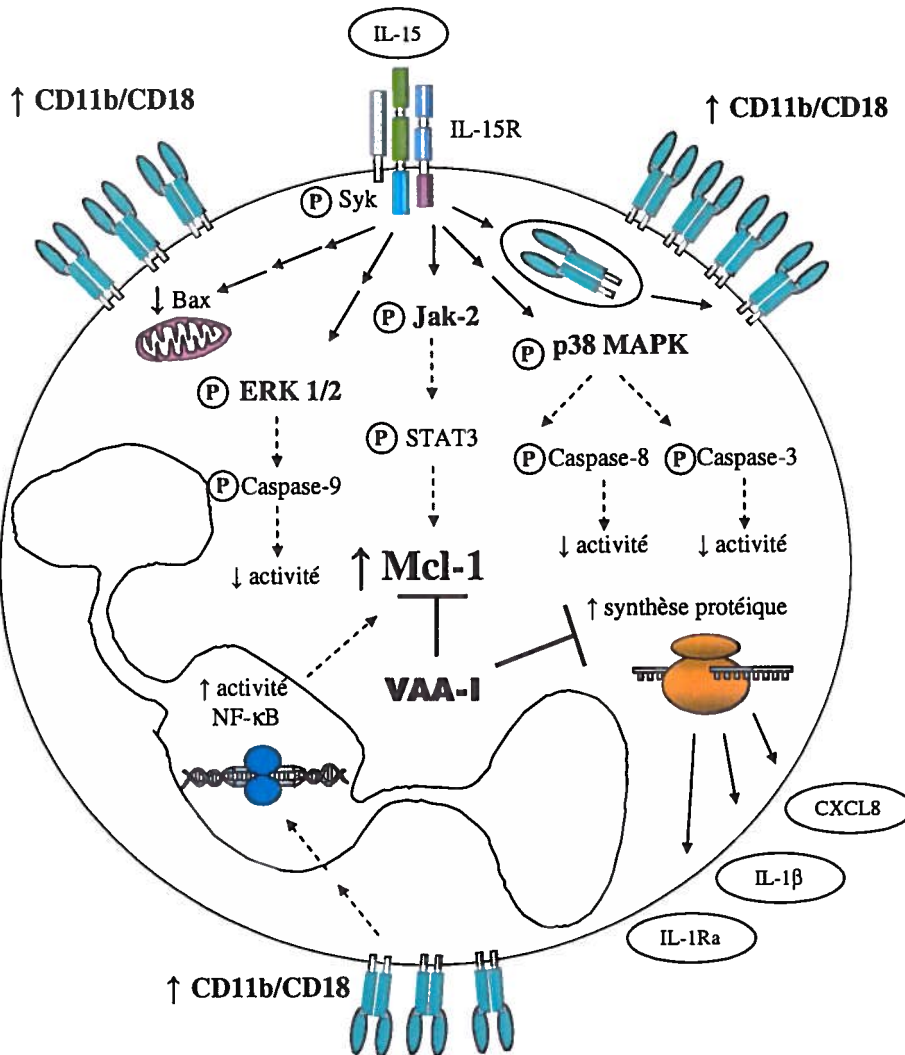


Figure 10 : Modèle des différentes voies de signalisation activées par l'IL-15 dans les neutrophiles. La liaison de l'IL-15 à son récepteur induit (→) la phosphorylation de Jak-2, ERK1/2 et p38 MAPK. Il a également été démontré que l'IL-15 stimule la phosphorylation de Syk et son association physique à l'IL-15R α . L'IL-15 augmente aussi l'expression de CD11b/CD18. Il est possible que l'association physique de Syk à l'IL-15R α empêche la liaison de Syk à CD18, ce qui permet d'augmenter l'avidité des intégrines et l'adhésion des neutrophiles. Il est également possible que NF- κ B soit l'une des molécules activées par l'augmentation de l'expression de CD11b/CD18. L'IL-15 stimule la synthèse protéique *de novo* et augmente la sécrétion de CXCL8, IL-1 β et IL-1Ra. L'IL-15 augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, possiblement en activant NF- κ B et/ou STAT3, et réduit celle de la protéine pro-apoptotique Bax, ce qui a pour conséquence de retarder l'apoptose spontanée. Il a été montré que la phosphorylation de p38 MAPK et ERK1/2 induit la phosphorylation de la caspases-3, -8 et -9, ce qui diminue leur activité enzymatique. Ce mécanisme reste toutefois à démontrer (□⇒). La lectine de plante VAA-I peut inhiber (⊥) la synthèse protéique *de novo* et le retard d'apoptose induit par l'IL-15. Les caractères en gras représentent les voies de signalisation ayant été déterminées lors de cette étude.

Nos résultats indiquent que la VAA-I n'induit pas la phosphorylation sur résidus sérine et thréonine dans les neutrophiles (Figure 1/Article I). Nous avons préalablement démontré que l'induction de l'apoptose par la VAA-I dans les neutrophiles était indépendante de la phosphorylation sur résidus tyrosine (Savoie *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que la VAA-I induit ses effets indépendamment de la phosphorylation sur résidus sérine, thréonine ou tyrosine des protéines intracellulaires. Nous avons récemment montré que l'internalisation de la VAA-I est nécessaire à l'induction d'apoptose des neutrophiles, puisque la pré-incubation de ces cellules avec un inhibiteur du transport vésiculaire, la bréfeldine A, bloque entièrement leur apoptose (Lavastre *et al.*, 2002). Une autre équipe avait également montré que l'induction de l'apoptose par la VAA-I dans la lignée T Jurkat et la lignée B BJAB est indépendante d'un récepteur de surface et nécessite l'internalisation de la molécule (Bantel *et al.*, 1999). Il a toutefois été montré, par gel d'électrophorèse en deux dimensions, que la VAA-I induit l'incorporation de [³²P]phosphate dans une protéine d'environ 28 kDa dans la lignée monocyttaire THP-1 (Gabius *et al.*, 1992). L'agglutinine *Viscum album* L. *coloratum*, une lectine du gui coréen, entraîne quant à elle l'apoptose en induisant la phosphorylation de c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) dans la lignée myélomonocytaire U937 et dans les cellules Hep3B provenant d'un carcinome hépatique (Park *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004). Cette même lectine induit aussi l'apoptose en provoquant la déphosphorylation de la protéine kinase B (PKB/Akt) dans les cellules A253 provenant d'un carcinome de la peau (Choi *et al.*, 2004). La différence entre ces résultats et l'absence de phosphorylation que nous observons dans les extraits protéiques totaux de neutrophiles humains fraîchement isolés et stimulés peut s'expliquer, en partie, par le type de cellule et leur degré de transformation (primaire vs immortalisé). De plus, nous n'excluons pas la possibilité qu'une protéine en particulier, par exemple JNK ou Akt, puisse être phosphorylée ou déphosphorylée par la VAA-I dans les neutrophiles et ce, indépendamment d'une liaison à un récepteur de surface. L'utilisation de techniques plus sensibles, comme l'immunoprécipitation, le gel d'électrophorèse en deux dimensions ou l'utilisation d'anticorps phosphospécifiques, pourrait permettre de vérifier l'état de phosphorylation d'une protéine donnée.

Nous avons aussi vérifié la capacité de la VAA-I à moduler les réponses des neutrophiles induites par l'IL-15. Nous montrons que la VAA-I augmente la phagocytose des neutrophiles et ce, uniquement à des concentrations élevées (Figure 2/Article I). Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant rapporté une hausse semblable de l'activité phagocytaire des neutrophiles par cette lectine à des concentrations élevées (Metzner *et al.*, 1985; Stein *et al.*, 1999; Stoika *et al.*, 2001). Une étude a également montré que l'injection de la VAA-I chez le lapin et chez des patients atteints de cancer augmente l'activité phagocytaire des granulocytes (Hajto *et al.*, 1989). Ceci suggère que la VAA-I, à concentrations élevées, est capable d'exercer son activité cytotoxique sur les cellules tumorales et d'augmenter parallèlement la phagocytose médiée par les cellules de l'hôte. De plus, nous montrons que la VAA-I favorise la phagocytose induite par l'IL-15 (Figure 2/Article I). Ceci indique que l'utilisation simultanée de l'IL-15 et de la VAA-I dans un contexte thérapeutique stimulerait ou, du moins, ne diminuerait pas cette fonction importante des neutrophiles. Contrairement à l'IL-15, il a été montré que l'immunothérapie utilisant l'IL-2 affecte les fonctions des neutrophiles et ceci contribue à l'augmentation de la susceptibilité aux infections bactériennes chez les patients atteints de cancer (Jablons *et al.*, 1990; Klempner *et al.*, 1990). L'IL-15 présente donc un avantage thérapeutique sur l'IL-2 qui mérite d'être mieux caractérisé.

Nous avons préalablement montré que la VAA-I pouvait inhiber le retard d'apoptose induit par le GM-CSF dans les neutrophiles (Savoie *et al.*, 2000). Pour faire suite à cette étude, nous montrons que la VAA-I, à concentrations élevées, inhibe le retard d'apoptose induit par l'IL-15, tel que mesuré par cytologie et par visualisation de la dégradation de la gelsoline (Figures 3 et 4/Article I). Ceci corrèle avec une inhibition de la synthèse protéique *de novo* (Figure 5/Article I). Cette diminution des effets de l'IL-15 causée par la VAA-I sur les neutrophiles est d'intérêt pour l'élaboration d'une stratégie thérapeutique, comme une immunotoxine visant l'atténuation ou l'élimination des neutrophiles dans le contexte de maladies inflammatoires (**figure 10**). Il a été montré que, chez des patients atteints d'un lymphome de cellules B, l'administration d'une immunotoxine, composée de la ricine (une lectine de la même famille que la VAA-I) et d'un anticorps dirigée contre les molécules CD19 ou CD22 exprimées à la surface des

lymphocytes B, entraînait une diminution de la tumeur (Amlot *et al.*, 1993; Stone *et al.*, 1996). Ainsi, il serait possible d'envisager le développement d'une immunotoxine composée de la VAA-I qui ciblerait directement le neutrophile. L'administration de cette immunotoxine pourrait permettre d'éliminer des neutrophiles suractivés dans différentes maladies inflammatoires où des quantités élevées d'IL-15 ont été détectées, comme dans le cas de l'arthrite rhumatoïde.

Interactions neutrophiles/IL-21

Les résultats de certaines études suggèraient qu'une interaction était possible entre l'IL-21 et les neutrophiles *in vivo* (Parrish-Novak *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Di Carlo *et al.*, 2004). Nous avons donc utilisé le modèle murin de la poche d'air afin de vérifier si l'IL-21 serait impliquée dans le recrutement de neutrophiles. Nos résultats montrent que l'IL-21 induit le recrutement simultané de neutrophiles et de monocytes/macrophages (Figures 1 et 2/Article IV). Deux équipes ont également observé un recrutement semblable induit par l'IL-21. En effet, l'équipe de Di Carlo (2004) a constaté que l'injection d'un mélanome génétiquement modifié pour sécréter de l'IL-21 induit une accumulation massive de neutrophiles et macrophages au site de la tumeur (Di Carlo *et al.*, 2004). Pour sa part, l'équipe de Parrish-Novak (2002) a observé que la surexpression de l'IL-21 chez des souris induit l'accumulation de neutrophiles et de macrophages dans certains tissus (observations non publiées citées dans Parrish-Novak *et al.*, 2002). Toutefois, nous montrons que les neutrophiles n'expriment pas l'IL-21R α (Figure 4/Article IV), ce qui permet d'expliquer que leurs fonctions ne sont pas modulées par cette cytokine *in vitro* (Figures 6 et 7/Article IV). Ceci suggère que l'expression de la chaîne CD132 est insuffisante à elle seule pour permettre la modulation des fonctions des neutrophiles par l'IL-21.

Comme l'IL-21 n'est pas un chimioattractant des neutrophiles *in vitro* (Figure 7/Article IV), nous croyons que la production de substances chimiotactiques par d'autres types cellulaires, dont les monocytes/macrophages, serait responsable de leur recrutement *in vivo*. Nous avons donc vérifié la présence de la cytokine IL-6 et des chimiokines

CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES et CXCL2/MIP-2, connues pour attirer à la fois les neutrophiles et les monocytes/macrophages (Ugucioni *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2003; von Stebut *et al.*, 2003; Jaramillo *et al.*, 2004). Nos résultats montrent que l'IL-21 attire les cellules par un mécanisme indépendant de l'IL-6, de CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES et CXCL2/MIP-2 (Figure 3/Article IV). Il serait donc intéressant d'effectuer une cinétique plus détaillée lors de la récolte des fluides de souris stimulés par l'IL-21 afin de détecter un ou des chimioattractant(s) responsable(s) du recrutement des neutrophiles et des monocytes/macrophages. Deux candidats potentiels sont l'IFN- γ et le TNF- α puisque la présence de ces deux cytokines, en plus des neutrophiles et des macrophages, a été détectée au site d'une tumeur génétiquement modifiée pour sécréter de l'IL-21 (Di Carlo *et al.*, 2004). En fait, il a été montré que l'IFN- γ et le TNF- α augmente la migration et/ou le recrutement des neutrophiles et des macrophages *in vivo* (Carvalho-Pinto *et al.*, 2002; McLoughlin *et al.*, 2003; von Stebut *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2004; Dangerfield *et al.*, 2005). De plus, ces deux cytokines sont de puissants activateurs des fonctions des neutrophiles et des macrophages (Virelizier et Arenzana-Seisdedos, 1985; Klebanoff *et al.*, 1986; Cavaillon, 1994; Ellis et Beaman, 2004). Des études supplémentaires seraient donc requises afin de vérifier s'il est possible de détecter l'IFN- γ et/ou le TNF- α dans les fluides de souris stimulées par l'IL-21. Certains de nos résultats indiquent que les macrophages pourraient être impliqués dans le recrutement de neutrophiles *in vivo*. En effet, nous montrons que les macrophages expriment l'IL-21R α (Figure 9/Article IV) et que leur stimulation par l'IL-21 *in vitro* induit la sécrétion de CXCL8/IL-8 (Figure 10/Article IV). Ce puissant chimioattractant des neutrophiles n'étant pas exprimé chez la souris, il serait intéressant d'identifier un homologue murin dans le modèle de la poche d'air. Nous proposons donc que l'IL-21 puisse agir indirectement sur le recrutement des neutrophiles par l'activation des monocytes et des macrophages (et possiblement des cellules résidentes) au site inflammatoire avec pour conséquence la production de chimiokines agissant directement sur les neutrophiles (**figure 11**).

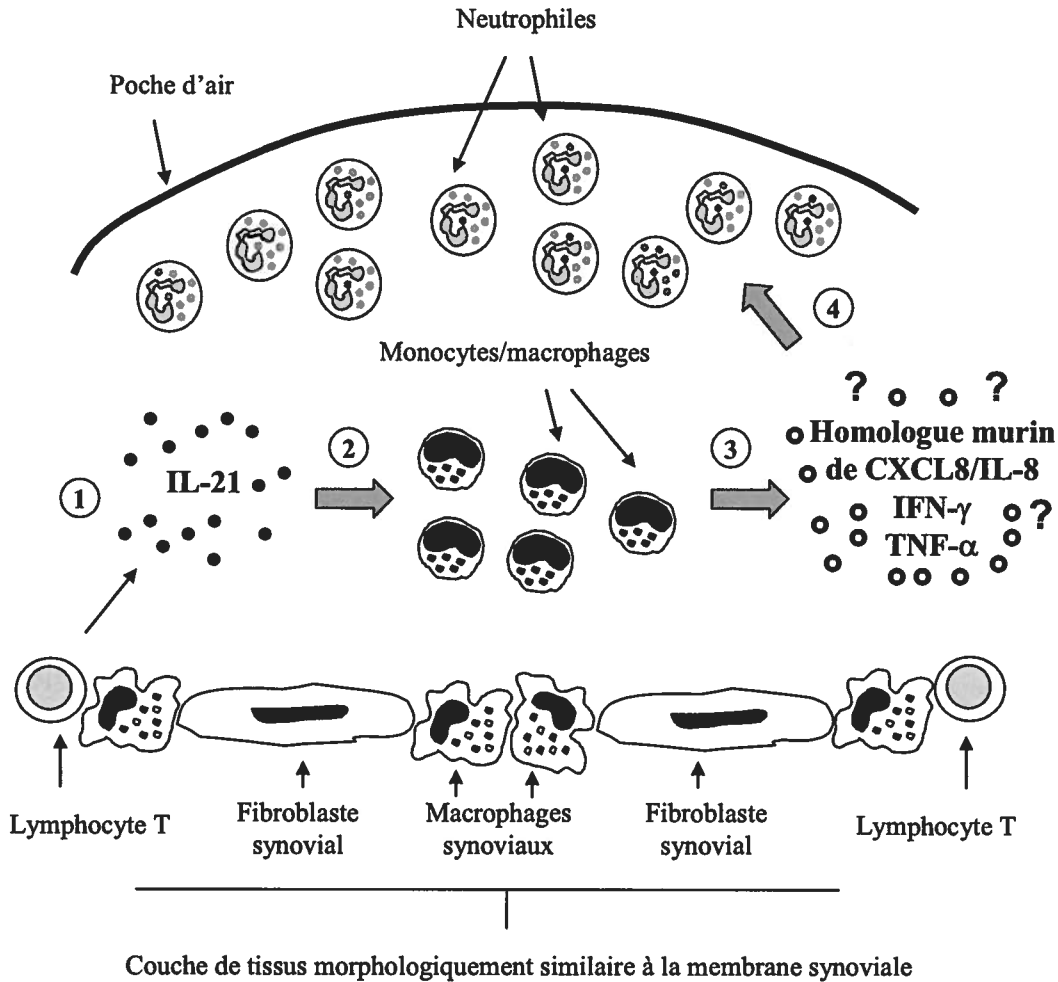


Figure 11: Mode d'action potentiel du recrutement des neutrophiles et des monocytes/macrophages induit par l'IL-21 dans le modèle de la poche d'air. L'IL-21 est injectée dans la cavité produite par l'injection d'air. Dans des conditions physiologiques, ce sont les lymphocytes T qui sont responsables de la production de niveaux élevés d'IL-21 retrouvés dans les fluides biologiques (1). L'IL-21 va alors agir directement sur les monocytes/macrophages qui expriment l'IL-21R (2). Ces derniers vont synthétiser un chimioattractant, possiblement un homologue murin de CXCL8/IL-8, ou encore des cytokines, comme le TNF- α et l'IFN- γ (3). Ces molécules seront responsables du recrutement de neutrophiles, et possiblement de leur activation, au site inflammatoire (4).

L'expression de l'IL-21R α à la surface des monocytes et des macrophages, ainsi que l'absence de son expression par les neutrophiles, suggère fortement que cette chaîne est modulée lors de la différenciation des pro-myélocytes en ces types cellulaires. Nous

avons utilisé la lignée cellulaire HL-60 afin de vérifier cette hypothèse. Nous montrons que les cellules HL-60 expriment l'IL-21R α (Figure 5/Article IV). L'expression de cette chaîne du récepteur diminue lors de la différenciation des cellules HL-60 en neutrophiles alors qu'elle persiste lors de leur différenciation en monocytes et macrophages, ce qui permet de confirmer nos résultats sur l'expression de l'IL-21R α par les cultures primaires de neutrophiles, monocytes et macrophages (Figure 5 et 9/Article IV). Il est possible que la différenciation des HL-60 module l'expression ou l'activité d'un facteur de transcription essentiel à la synthèse de l'IL-21R α . Par exemple, une diminution de l'expression de NF- κ B et de son activité a été observée lors de la différenciation des cellules HL-60 en neutrophiles (Browning *et al.*, 1997). Au contraire, une hausse de son expression et de son activité est observée lors de la différenciation des HL-60 en macrophages (Hass *et al.*, 1992; Cannon *et al.*, 1993). Il est donc possible que NF- κ B (ou un autre facteur de transcription) soit impliqué dans la régulation de l'expression de l'IL-21R α par les cellules HL-60. Le promoteur de l'IL-21R α et les facteurs de transcription responsables de son expression n'ont pas encore été identifiés. Leur caractérisation prochaine pourra permettre d'identifier des candidats jouant un rôle potentiel dans la modulation de l'IL-21R α dans les cellules HL-60.

À ce jour, il a été montré que seules les cellules T CD4⁺, préférentiellement de type Th2, sécrètent de l'IL-21 (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Wurster *et al.*, 2002). Comme les cellules HL-60 expriment l'IL-21R α , nous avons vérifié si ces cellules pouvaient potentiellement produire l'IL-21 qui agirait alors de manière autocrine. L'utilisation d'un anticorps reconnaissant à la fois le polypeptide précurseur et la forme mature de l'IL-21 nous a permis de montrer que les cellules HL-60 expriment l'IL-21 (Figure 13/Annexe). De plus, nous montrons que son expression diminue lors de la différenciation des HL-60 en neutrophiles et qu'elle est totalement absente dans les neutrophiles matures (Figure 13/Annexe). Ce résultat indique que des cellules d'origine myéloïde peuvent potentiellement produire de l'IL-21. Nous n'avons pas pu vérifier si les HL-60 sécrètent l'IL-21, puisque aucun anticorps reconnaissant la forme tridimensionnelle de la protéine en conditions non dénaturantes n'était disponible commercialement lors de cette étude. Il serait donc intéressant de vérifier si cette production d'IL-21 par des cellules myéloïdes

est restreinte aux cellules cancéreuses telles les cellules HL-60. Comme il a été montré que l'IL-21 est un facteur de croissance et de survie pour certains types de cancer (Brenne *et al.*, 2002), il est possible d'envisager que cette cytokine soit produite par les cellules cancéreuses elles-mêmes et qu'elle agisse de manière autocrine sur leur prolifération. Cette hypothèse reste toutefois à confirmer.

Lors de la stimulation des cellules HL-60 avec l'IL21, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 (Figure 5/Article IV). Il a été montré que l'activation de cette voie de signalisation est généralement associée aux premières étapes de la différenciation des cellules HL-60 (Yen *et al.*, 1998; Yen *et al.*, 1999; Wang et Studzinski, 2001; Miranda *et al.*, 2002). Nous avons donc évalué les effets de l'IL-21 sur l'expression de CD11b et CD14, deux marqueurs de différenciation, ainsi que sur le cycle cellulaire des HL-60. Nos résultats montrent que l'IL-21 ne module ni le cycle cellulaire ni l'expression de CD11b et CD14 à la surface des cellules (Figure 8/Article IV). Ceci indique que l'IL-21 n'induit pas la différenciation des cellules HL-60 en neutrophiles, monocytes ou macrophages. Un résultat semblable a été observé lors de la stimulation des cellules de la moelle osseuse (MO) avec une combinaison de GM-CSF et d'IL-21. En effet, l'équipe de Brandt (2003) a observé que ces deux cytokines ne stimulent pas la différenciation des cellules de la MO en cellules B B220⁺, cellules NK NK1.1⁺, cellules T CD3⁺, granulocytes Gr-1⁺, macrophages CD14⁺ et DC CD8α⁺ (Brandt *et al.*, 2003a). Il est possible que l'IL-21 puisse agir sur des cultures primaires de cellules immatures d'origine myéloïde, mais que ces effets ne soient pas détectables dans les cellules cancéreuses comme les HL-60. En effet, le rôle de l'IL-21 sur la prolifération et la survie des cellules HL-60 non différenciées est difficile à évaluer puisque ces cellules ont un potentiel élevé de prolifération et ce, même sans l'ajout de facteurs essentiels dans le milieu de culture. L'utilisation de cultures primaires pourrait donc permettre de déterminer le rôle de l'IL-21 sur la prolifération et la survie des cellules immatures. À cet égard, nous avons vérifié les effets de l'IL-21 sur la prolifération et la survie de cultures primaires de cellules d'origine lymphoïde et myéloïde de la MO. Nous montrons que l'IL-21, tout comme l'IL-15 et le LPS, augmente l'activité mitochondriale et retarde l'apoptose induite par la privation de facteurs essentiels des cellules totales de la MO.

Toutefois, contrairement à l'IL-15 et au LPS, cette cytokine est incapable d'induire leur prolifération (Figures 1 et 2/Article V). L'ajout simultané de 10 ng/mL d'IL-21 et d'IL-15, une concentration sans effet lorsqu'utilisée individuellement, permet d'augmenter de manière significative l'activité mitochondriale des cellules de la MO (Figure 14/Annexe). Cet effet combiné pourrait être relié à une augmentation de l'expression de l'un ou l'autre des récepteurs à la surface des cellules, à la stimulation de sous-populations différentes par chacune des cytokines ou encore à l'activation d'une population cellulaire qui sécréterait un facteur de prolifération pour une autre population cellulaire. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses. Un effet synergique entre l'IL-21 et l'IL-15 a été observé dans la régulation et l'expansion des cellules T CD8⁺ (Zeng *et al.*, 2005). Plusieurs équipes ont montré que le facteur de transcription NF-κB joue un rôle dans l'activation des fonctions de différents types cellulaires. Il a également été montré que l'activation de NF-κB par l'IL-15 dans les éosinophiles permet de retarder leur apoptose spontanée (Hoontrakoon *et al.*, 2002). De plus, NF-κB est l'une des molécules de signalisation impliquées dans l'augmentation de l'expression de la COX-2 induite par l'IL-15 dans les synoviocytes (Min *et al.*, 2004). Finalement, il a été observé que NF-κB est activé par l'IL-15 dans les cellules progénitrices de la MO (Giron-Michel *et al.*, 2003). Nous avons donc décidé d'utiliser des souris déficientes pour l'expression de NF-κB afin de vérifier le rôle de ce facteur de transcription dans la prolifération et/ou la survie induite par l'IL-21 et l'IL-15 des cellules de la MO. Nos résultats indiquent que NF-κB joue un rôle important dans la prolifération induite par l'IL-15, mais qu'il n'est pas requis dans le retard d'apoptose des cellules de la MO induit par l'IL-15 ou l'IL-21 (Figures 6 et 7/Article V).

La séparation subséquente des cellules de la MO en cellules lymphoïdes (CD11b⁻) et myéloïdes (CD11b⁺) nous a permis de constater que les effets de l'IL-21 et de l'IL-15 sur la prolifération et/ou la survie sont principalement observés sur la population lymphoïde de la MO (Figures 3 et 4/Article V). Ceci concorde avec l'expression de l'IL-21Rα uniquement à la surface des cellules lymphoïdes ainsi que l'expression de l'IL-15Rα par les cellules lymphoïdes et myéloïdes. L'IL-15Rα est toutefois exprimé plus fortement par les cellules lymphoïdes (Figure 5/Article V). Il est cependant envisageable que les effets

de ces cytokines soient dirigés sur des sous-populations de cellules exprimant plus fortement le récepteur spécifique. Par exemple, il a été observé que peu de cellules B220⁺ expriment l'IL-21R α dans la MO et que l'expression de IL-21R α est modulée lors de la maturation des lymphocytes B (Jin *et al.*, 2004). Il est donc concevable que les effets de l'IL-21 impliquent plutôt les lymphocytes B de la MO que les autres types cellulaires. Des expériences supplémentaires sont donc requises afin de déterminer sur quelles sous-populations des cellules lymphoïdes et myéloïdes l'IL-21 et l'IL-15 exercent leurs effets. Nos résultats suggèrent que l'IL-15 est à la fois un facteur de croissance et de survie des cellules lymphoïdes de la MO alors que l'IL-21 est plutôt un facteur anti-apoptotique de ces cellules.

Perspectives

Plusieurs expériences peuvent être suggérées afin d'accroître nos connaissances sur les interactions entre l'IL-15, l'IL-21 et les neutrophiles. La caractérisation des membres de la voie de signalisation Jak-STAT, autres que Jak-2 et STAT5, impliqués dans le retard d'apoptose induit par l'IL-15 pourrait permettre d'identifier une voie de signalisation propre aux neutrophiles. Les résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent fortement que STAT3 soit l'une des molécules impliquées (observations non publiées). Il a été montré que l'administration de tyrphostin B42 (AG490), un inhibiteur de la voie de signalisation Jak-STAT, permet de prévenir l'encéphalomyélite allergique expérimentale dans un modèle murin (Bright *et al.*, 1999). Une thérapie impliquant l'inhibition de la signalisation induite par l'IL-15 dans les neutrophiles pourrait donc être envisagée. Tel que mentionné précédemment, il serait possible de développer une immunotoxine composée de la VAA-I qui ciblerait directement le neutrophile. Cette immunotoxine permettrait d'inhiber la synthèse protéique et le retard d'apoptose induit par l'IL-15 et favoriserait l'élimination des neutrophiles par apoptose.

Ensuite, il serait intéressant de vérifier si l'IL-17 est bel et bien un médiateur impliqué dans la production locale d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2 induite par l'IL-15 dans le modèle murin de la poche d'air. Il serait donc possible d'effectuer un test ELISA afin de vérifier

si l'IL-17 est présente dans les exsudats provenant du lavage de la poche d'air de souris normales stimulées avec de l'IL-15. Ensuite, il serait possible de vérifier le rôle de l'IL-17 dans le recrutement des neutrophiles et dans la production d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2 en injectant l'IL-15 dans une souris déficiente pour l'expression de l'IL-17 (IL-17^{-/-}) (Nakae *et al.*, 2002). Une étude ayant utilisé les souris IL-17^{-/-} a d'ailleurs montré que l'arthrite induite par le collagène est inhibée dans ces souris, suggérant un rôle important de l'IL-17 dans les processus inflammatoires (Nakae *et al.*, 2003). L'identification de cet intermédiaire permettrait d'établir une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de maladies inflammatoires impliquant des niveaux élevés d'IL-15.

Il serait également important de vérifier si les intégrines CD11b et CD18 à la surface des neutrophiles et la molécule d'adhésion CD54 des cellules A549 sont effectivement responsables de l'augmentation de l'adhésion induite par l'IL-15 entre ces deux types cellulaires. De fait, il serait possible d'évaluer l'adhésion induite par l'IL-15 en incubant les cellules avec des anticorps neutralisants contre chacune de ces molécules. Il a été montré que l'injection intraveineuse d'anticorps anti-CD11b ou anti-CD18 permet de réduire l'activation des neutrophiles induite par l'instillation d'acide dans les voies respiratoires de la souris (Folkesson et Matthay, 1997). Ceci suggère qu'une thérapie visant la neutralisation des molécules d'adhésion pourrait être bénéfique pour le traitement de maladies comme l'arthrite et la sarcoïdose.

Finalement, il serait intéressant d'identifier les substances chimiotactiques impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes/macrophages induit par l'IL-21. L'identification de ce ou ces substance(s) pourrait permettre d'établir des cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies inflammatoires impliquant l'IL-21. De plus, il serait intéressant de déterminer les rôles de l'IL-21 et de l'IL-21R α dans les cellules HL-60. En effet, la détermination que cette cytokine puisse agir de manière autocrine sur la prolifération des cellules cancéreuses permettra de cibler l'IL-21 ou son récepteur lors de thérapie anti-tumorale.

Conclusion

Nos résultats ont permis de montrer que :

- l'IL-15 induit majoritairement le recrutement de neutrophiles *in vivo* ;
- l'activation des neutrophiles par l'IL-15 se traduit également par l'augmentation des intégrines CD11b/CD18 à leur surface et par l'augmentation de leur adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires A549 ;
- l'IL-15 retarde l'apoptose des neutrophiles en augmentant la phosphorylation de Jak-2, ERK1/2 et p38 MAPK, tout en augmentant l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 ;
- la VAA-I peut inhiber le retard d'apoptose et la synthèse protéique *de novo* induit par l'IL-15 dans les neutrophiles ;
- l'IL-21 induit le recrutement simultané de neutrophiles et de monocytes/macrophages *in vivo* ;
- les fonctions des neutrophiles ne sont pas modulées par l'IL-21 puisque ceux-ci n'expriment l'IL-21R α ;
- les macrophages pourraient être impliqués dans le recrutement des neutrophiles, puisque ceux-ci expriment l'IL-21R α et sécrètent du CXCL8/IL-8 suite à leur stimulation *in vitro* avec l'IL-21

Nous pouvons conclure que l'expression simultanée des trois chaînes du récepteur à l'IL-15 permet la modulation de différentes fonctions des neutrophiles. Nos résultats suggèrent que l'IL-15 peut influencer directement le sort des neutrophiles dans certaines maladies en impliquant leur recrutement au site inflammatoire, l'augmentation de leur adhésion aux cellules environnantes et la modulation de leur apoptose spontanée. Ces résultats concordent avec la détection de concentrations élevées d'IL-15 et la persistance des neutrophiles dans les maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde et la sarcoïdose. Il est toutefois possible de moduler l'activation des neutrophiles par l'IL-15 en utilisant la VAA-I. Cette dernière pourrait être potentiellement utilisée lors de

thérapies visant l'élimination des neutrophiles suractivés dans certaines maladies. Par contre, l'expression de CD132 à la surface des neutrophiles est insuffisante pour que l'IL-21 module directement les réponses de ces cellules. L'IL-21 agirait indirectement sur le recrutement des neutrophiles en augmentant la sécrétion de chimiokines par les macrophages. Les cellules HL-60, cellules immatures d'origine myéloïde, expriment l'IL-21R α , suggérant que l'IL-21 puisse agir directement sur ces cellules. Toutefois, les effets de l'IL-21 sur les cellules d'origine myéloïde sont encore inconnus, mais n'impliquent pas leur prolifération, ni leur survie. La caractérisation des interactions entre les neutrophiles, l'IL-15 et l'IL-21 permet une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant leur activation et permettra le développement d'outils thérapeutiques appropriés pour le traitement de maladies inflammatoires et auto-immunes.

Bibliographie

ABDELILAH, S., K. Latifa, N. Esra, L. Cameron, L. Bouchaib, N. Nicolaides, R. Levitt et Q. Hamid. 2001. "Functional expression of IL-9 receptor by human neutrophils from asthmatic donors: role in IL-8 release". Journal of Immunology, vol. 166, p. 2768-74.

ADAMS, J. M. et S. Cory. 1998. "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival". Science, vol. 281, p. 1322-6.

ADUNYAH, S. E., B. J. Wheeler et R. S. Cooper. 1997. "Evidence for the involvement of LCK and MAP kinase (ERK-1) in the signal transduction mechanism of interleukin-15". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 232, p. 754-8.

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.

AGOSTINI, C., L. Trentin, A. Perin, M. Facco, M. Siviero, F. Piazza, U. Basso, F. Adami, R. Zambello et G. Semenzato. 1999. "Regulation of alveolar macrophage-T cell interactions during Th1-type sarcoid inflammatory process". American Journal of Physiology, vol. 277, p. L240-50.

AGOSTINI, C., L. Trentin, R. Sancetta, M. Facco, C. Tassinari, A. Cerutti, M. Bortolin, A. Milani, M. Siviero, R. Zambello et G. Semenzato. 1997. "Interleukin-15 triggers activation and growth of the CD8 T-cell pool in extravascular tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome". Blood, vol. 90, p. 1115-23.

AHMAD, R., S. T. Sindhu, E. Toma, R. Morisset et A. Ahmad. 2003. "Studies on the production of IL-15 in HIV-infected/AIDS patients". Journal of Clinical Immunology, vol. 23, p. 81-90.

AJASEKHAR, L., L. B. Liou, C. Y. Chan, W. P. Tsai et C. Y. Cheng. 2004. "Matrix metalloproteinase-8 in sera and from polymorphonuclear leucocytes in rheumatoid arthritis: in vitro characterization and correlation with disease activity". Clinical and Experimental Rheumatology, vol. 22, p. 597-602.

AKGUL, C., D. A. Moulding et S. W. Edwards. 2001. "Molecular control of neutrophil apoptosis". FEBS Letters, vol. 487, p. 318-22.

AKGUL, C., P. C. Turner, M. R. White et S. W. Edwards. 2000. "Functional analysis of the human MCL-1 gene". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 57, p. 684-91.

ALLARD, E.-L., J. Rooney et N. Labrecque. 2004. "Régulation du choix de différenciation des précurseurs hématopoïétiques par l'IL-21". In 72^e Congrès de l'ACFAS (Montréal, 10 mai 2004). Montréal, Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

AL-MUGHHALES, J., T. H. Blyth, J. A. Hunter et P. C. Wilkinson. 1996. "The chemoattractant activity of rheumatoid synovial fluid for human lymphocytes is due to multiple cytokines". Clinical and Experimental Immunology, vol. 106, p. 230-6.

AL-SHAMI, A., S. G. Bourgoïn et P. H. Naccache. 1997. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. I. Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and inhibition by phorbol esters". Blood, vol. 89, p. 1035-44.

AL-SHAMI, A., W. Mahanna et P. H. Naccache. 1998. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 1058-63.

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.

ALDRIDGE, A. J. 2002. "Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome". European Journal of Surgery, vol. 168, p. 204-14.

ALLAN, L. A., N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak et P. R. Clarke. 2003. "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK". Nat Cell Biol, vol. 5, p. 647-54.

ALLAVENA, P., G. Giardina, G. Bianchi et A. Mantovani. 1997. "IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium". Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 729-35.

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.

ALONSO-LEBRERO, J. L., J. M. Serrador, C. Dominguez-Jimenez, O. Barreiro, A. Luque, M. A. del Pozo, K. Snapp, G. Kansas, R. Schwartz-Albiez, H. Furthmayr, F. Lozano et F. Sanchez-Madrid. 2000. "Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin glycoprotein ligand 1 and intercellular adhesion molecule 3 with moesin and ezrin in myeloid cells". Blood, vol. 95, p. 2413-9.

ALVARADO-KRISTENSSON, M., F. Melander, K. Leandersson, L. Ronnstrand, C. Wernstedt et T. Andersson. 2004. "p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils". Journal of Experimental Medicine, vol. 199, p. 449-58.

- ALVARADO-KRISTENSSON, M., M. I. Porn-Ares, S. Grethe, D. Smith, L. Zheng et T. Andersson. 2002. "p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis". FASEB Journal, vol. 16, p. 129-31.
- ALVAREZ, B., N. Carbo, J. Lopez-Soriano, R. H. Drivdahl, S. Busquets, F. J. Lopez-Soriano, J. M. Argiles et L. S. Quinn. 2002. "Effects of interleukin-15 (IL-15) on adipose tissue mass in rodent obesity models: evidence for direct IL-15 action on adipose tissue". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1570, p. 33-7.
- ALVES, N. L., F. A. Arosa et R. A. van Lier. 2005. "IL-21 Sustains CD28 Expression on IL-15-Activated Human Naive CD8+ T Cells". Journal of Immunology, vol. 175, p. 755-62.
- ALVES, N. L., B. Hooibrink, F. A. Arosa et R. A. van Lier. 2003. "IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro". Blood, vol. 102, p. 2541-6.
- AMLOT, P. L., M. J. Stone, D. Cunningham, J. Fay, J. Newman, R. Collins, R. May, M. McCarthy, J. Richardson, V. Ghetie, O. Ramilo, P.E Thorpe, J. W. Uhr et E. S. Vitetta. 1993. "A phase I study of an anti-CD22-deglycosylated ricin A chain immunotoxin in the treatment of B-cell lymphomas resistant to conventional therapy". Blood, vol. 82, p. 2624-33.
- 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, K. Grabstein et D. Cosman. 1995a. "Chromosomal assignment and genomic structure of Il15". Genomics, vol. 25, p. 701-6.
- 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 et D. Cosman. 1995b. "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.
- ANGIOLILLO, A. L., H. Kanegane, C. Sgadari, G. H. Reaman et G. Tosato. 1997. "Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 233, p. 231-7.
- AOSHIBA, K., S. Yasui, M. Hayashi, J. Tamaoki et A. Nagai. 1999. "Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils". Journal of Immunology, vol. 162, p. 1692-700.
- ARINGER, M., G. H. Stummvoll, G. Steiner, M. Koller, C. W. Steiner, E. Hofler, H. Hiesberger, J. S. Smolen et W. B. Graninger. 2001. "Serum interleukin-15 is elevated in systemic lupus erythematosus". Rheumatology, vol. 40, p. 876-81.

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.

ARMITAGE, R. J., S. F. Ziegler, D. J. Friend, L. S. Park et W. C. Fanslow. 1992. "Identification of a novel low-affinity receptor for human interleukin-7". Blood, vol. 79, p. 1738-45.

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.

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.

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 trans-activates 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.

BADOLATO, R., A. N. Ponzi, M. Millesimo, L. D. Notarangelo et T. Musso. 1997. "Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes". Blood, vol. 90, p. 2804-9.

BAINTON, D. F. et M. G. Farquhar. 1968. "Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smears". Journal of Cell Biology, vol. 39, p. 286-98.

BAINTON, D. F., J. L. Ulliyot et M. G. Farquhar. 1971. "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow". Journal of Experimental Medicine, vol. 134, p. 907-34.

BAKER, C. H. et F. L. Abel. 1995. "Macro- and microcirculatory effects of IL-15". Shock, vol. 4, p. 307-10.

BALASUBRAMANIAN, S., T. Chernov-Rogan, A. M. Davis, E. Whitehorn, E. Tate, M. P. Bell, G. Zurawski et R. W. Barrett. 1995. "Ligand binding kinetics of IL-2 and IL-15 to heteromers formed by extracellular domains of the three IL-2 receptor subunits". International Immunology, vol. 7, p. 1839-49.

BALENTIEN, E., J. H. Han, H. G. Thomas, D. Z. Wen, A. K. Samantha, C. O. Zachariae, P. R. Griffin, R. Brachmann, W. L. Wong, K. Matsushima et A. Richmond. 1990. "Recombinant expression, biochemical characterization, and biological activities of the human MGSA/gro protein". Biochemistry, vol. 29, p. 10225-33.

BALKWILL, F. R. et F. Burke. 1989. "The cytokine network". Immunology Today, vol. 10, p. 299-304.

BAMFORD, R. N., A. P. Battiata, J. D. Burton, H. Sharma et 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". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 2897-902.

BAMFORD, R. N., A. P. DeFilippis, N. Azimi, G. Kurys et T. A. Waldmann. 1998. "The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control". Journal of Immunology, vol. 160, p. 4418-26.

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.

BANTEL, H., I. H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff et S. Wesselborg. 1999. "Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis". Cancer Research, vol. 59, p. 2083-90.

BARREDA, D. R., P. C. Hanington et M. Belosevic. 2004. "Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors". Developmental and Comparative Immunology, vol. 28, p. 509-54.

BARZEGAR, C., R. Meazza, R. Pereno, C. Pottin-Clemenceau, M. Scudeletti, D. Brouty-Boye, C. Doucet, Y. Taoufik, J. Ritz, C. Musselli, Z. Mishal, C. Jasmin, F. Indiveri, S. Ferrini et B. Azzarone. 1998. "IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops". Oncogene, vol. 16, p. 2503-12.

BASLUND, B., N. Tvede, B. Danneskiold-Samsoe, P. Larsson, G. Panayi, J. Petersen, L. J. Petersen, F. J. Beurskens, J. Schuurman, J. G. van de Winkel, P. W. Parren, J. A. Gracie, S. Jongbloed, F. Y. Liew et I. B. McInnes. 2005. "Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study". Arthritis and Rheumatism, vol. 52, p. 2686-92.

BAUGHMAN, R. P., S. A. Strohofer, J. Buchsbaum et E. E. Lower. 1990. "Release of tumor necrosis factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis". Journal of Laboratory and Clinical Medicine, vol. 115, p. 36-42.

BAZAN, J. F. 1990. "Haemopoietic receptors and helical cytokines". Immunology Today, vol. 11, p. 350-4.

BAZZONI, F., M. A. Cassatella, F. Rossi, M. Ceska, B. Dewald et M. Baggiolini. 1991. "Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8". Journal of Experimental Medicine, vol. 173, p. 771-4.

BAZZONI, F., S. Giovedi, M. C. Kiefer et M. A. Cassatella. 1999. "Analysis of the Bak protein expression in human polymorphonuclear neutrophils". International Journal of Clinical and Laboratory Research, vol. 29, p. 41-5.

BECKER, T. C., E. J. Wherry, D. Boone, K. Murali-Krishna, R. Antia, A. Ma et R. Ahmed. 2002. "Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 195, p. 1541-8.

BENELLI, R., A. Albinì et D. Noonan. 2003. "Neutrophils and angiogenesis: potential initiators of the angiogenic cascade". Chem Immunol Allergy, vol. 83, p. 167-81.

BERARD, M., K. Brandt, S. Bulfone-Paus et D. F. Tough. 2003. "IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells". Journal of Immunology, vol. 170, p. 5018-26.

BERNASCONI, N. L., E. Traggiai et A. Lanzavecchia. 2002. "Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells". Science, vol. 298, p. 2199-202.

BIBER, J. L., S. Jabbour, R. Parihar, J. Dierksheide, Y. Hu, H. Baumann, P. Bouchard, M. A. Caligiuri et W. Carson. 2002. "Administration of two macrophage-derived interferon-gamma-inducing factors (IL-12 and IL-15) induces a lethal systemic inflammatory response in mice that is dependent on natural killer cells but does not require interferon-gamma". Cellular Immunology, vol. 216, p. 31-42.

BICKNELL, S., S. van Eeden, S. Hayashi, J. Hards, D. English et J. C. Hogg. 1994. "A non-radioisotopic method for tracing neutrophils in vivo using 5'-bromo-2'-deoxyuridine". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 10, p. 16-23.

BIFFL, W. L., E. E. Moore, F. A. Moore et C. C. Barnett Jr. 1996. "Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor". Journal of Trauma, vol. 40, p. 575-8; discussion 578-9.

BLANCO-JEREZ, C., J. F. Plaza, J. Masjuan, L. M. Orensanz et J. C. Alvarez-Cermeno. 2002. "Increased levels of IL-15 mRNA in relapsing--remitting multiple sclerosis attacks". Journal of Neuroimmunology, vol. 128, p. 90-4.

BLAUVELT, A., H. Asada, V. Klaus-Kovtun, D. J. Altman, D. R. Lucey et S. I. Katz. 1996. "Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation". Journal of Investigative Dermatology, vol. 106, p. 1047-52.

BOBER, L. A., T. A. Waters, C. C. Pugliese-Sivo, L. M. Sullivan, S. K. Narula et M. J. Grace. 1995. "IL-4 induces neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils". Clinical and Experimental Immunology, vol. 99, p. 129-36.

- BOCHKOV, V. N., A. Kadl, J. Huber, F. Gruber, B. R. Binder et N. Leitinger. 2002. "Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage". Nature, vol. 419, p. 77-81.
- BOEY, H., R. Rosenbaum, J. Castracane et L. Borish. 1989. "Interleukin-4 is a neutrophil activator". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 83, p. 978-84.
- BOGGS, D. R. 1967. "The kinetics of neutrophilic leukocytes in health and in disease". Seminars in Hematology, vol. 4, p. 359-86.
- BOUCHARD, A., C. Ratthe et D. Girard. 2004. "Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8". Journal of Leukocyte Biology, vol. 75, p. 893-900.
- BOUMA, G. et W. Strober. 2003. "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease". Nat Rev Immunol, vol. 3, p. 521-33.
- BOUSQUET, J., P. Chanez, J. Y. Lacoste, G. Barneon, N. Ghavanian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Lafontaine, P. Godard et F.-B. Michel. 1990. "Eosinophilic inflammation in asthma". New England Journal of Medicine, vol. 323, p. 1033-9.
- BRACH, M. A., S. deVos, H. J. Gruss et F. Herrmann. 1992. "Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death". Blood, vol. 80, p. 2920-4.
- BRADY, J., Y. Hayakawa, M. J. Smyth et S. L. Nutt. 2004. "IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells". Journal of Immunology, vol. 172, p. 2048-58.
- BRANDT, E., G. Woerly, A. B. Younes, S. Loiseau et M. Capron. 2000. "IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 125-30.
- BRANDT, K., S. Bulfone-Paus, D. C. Foster et R. Ruckert. 2003a. "Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation". Blood, vol. 102, p. 4090-8.
- BRANDT, K., S. Bulfone-Paus, A. Jenckel, D. C. Foster, R. Paus et R. Ruckert. 2003b. "Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo". Journal of Investigative Dermatology, vol. 121, p. 1379-82.
- BRAZIL, T. J., M. P. Dagleish, B. C. McGorum, P. M. Dixon, C. Haslett et E. R. Chilvers. 2005. "Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation". Clinical and Experimental Allergy, vol. 35, p. 854-65.
- BRECKENRIDGE, D. G. et D. Xue. 2004. "Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases". Current Opinion in Cell Biology, vol. 16, p. 647-52.

BREITMAN, T. R., S. E. Selonick et S. J. Collins. 1980. "Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 77, p. 2936-40.

BRENNAN, F. M., C. O. Zachariae, D. Chantry, C. G. Larsen, M. Turner, R. N. Maini, K. Matsushima et M. Feldmann. 1990. "Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells". European Journal of Immunology, vol. 20, p. 2141-4.

BRENNE, A. T., T. Baade Ro, A. Waage, A. Sundan, M. Borset et H. Hjorth-Hansen. 2002. "Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells". Blood, vol. 99, p. 3756-62.

BRENTJENS, R. J., J. B. Latouche, E. Santos, F. Marti, M. C. Gong, C. Lyddane, P. D. King, S. Larson, M. Weiss, I. Riviere et M. Sadelain. 2003. "Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15". Nature Medicine, vol. 9, p. 279-86.

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.

BRIGHT, J. J., C. Du et S. Sriram. 1999. "Tyrphostin B42 inhibits IL-12-induced tyrosine phosphorylation and activation of Janus kinase-2 and prevents experimental allergic encephalomyelitis". Journal of Immunology, vol. 162, p. 6255-62.

BRIZZI, M. F., M. G. Aronica, A. Rosso, G. P. Bagnara, Y. Yarden et L. Pegoraro. 1996. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 3562-7.

BROWNING, D. D., Z. K. Pan, E. R. Prossnitz et R. D. Ye. 1997. "Cell type- and developmental stage-specific activation of NF-kappaB by fMet-Leu-Phe in myeloid cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 7995-8001.

BUDAGIAN, V., E. Bulanova, Z. Orinska, T. Pohl, E. C. Borden, R. Silverman et S. Bulfone-Paus. 2004. "Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15". Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 42192-201.

BULANOVA, E., V. Budagian, Z. Orinska, H. Krause, R. Paus et S. Bulfone-Paus. 2003. "Mast cells express novel functional IL-15 receptor alpha isoforms". Journal of Immunology, vol. 170, p. 5045-55.

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.

BULFONE-PAUS, S., E. Bulanova, T. Pohl, V. Budagian, H. Durkop, R. Ruckert, U. Kunzendorf, R. Paus et H. Krause. 1999. "Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain". FASEB Journal, vol. 13, p. 1575-85.

BULFONE-PAUS, S., D. Ungureanu, T. Pohl, G. Lindner, R. Paus, R. Ruckert, H. Krause et U. Kunzendorf. 1997. "Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo". Nature Medicine, vol. 3, p. 1124-8.

BURKETT, P. R., R. Koka, M. Chien, S. Chai, D. L. Boone et A. Ma. 2004. "Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis". Journal of Experimental Medicine, vol. 200, p. 825-34.

BURKETT, P. R., R. Koka, M. Chien, S. Chai, F. Chan, A. Ma et D. L. Boone. 2003. "IL-15R alpha expression on CD8+ T cells is dispensable for T cell memory". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, p. 4724-9.

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.

BUSSING, A., K. Suzart et K. Schweizer. 1997. "Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts". Anti-Cancer Drugs, vol. 8 Suppl 1, p. S9-14.

BYKOVSKAIA, S. N., M. Buffo, H. Zhang, M. Bunker, M. L. Levitt, M. Agha, S. Marks, C. Evans, P. Ellis, M. R. Shurin et J. Shogan. 1999. "The generation of human dendritic and NK cells from hemopoietic progenitors induced by interleukin-15". Journal of Leukocyte Biology, vol. 66, p. 659-66.

CALL, D. R., J. A. Nemzek, S. J. Ebong, G. R. Bolgos, D. E. Newcomb, G. K. Wollenberg et D. G. Remick. 2001. "Differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2". Shock, vol. 15, p. 278-84.

CAMPBELL, H. D., G. C. Webb, T. Kono, T. Taniguchi, J. H. Ford et I. G. Young. 1992. "Assignment of the interleukin-2 receptor beta chain gene (*Il-2rb*) to band E on mouse chromosome 15". Genomics, vol. 12, p. 179-80.

CANNISTRA, S. A. et J. D. Griffin. 1988. "Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes". Seminars in Hematology, vol. 25, p. 173-88.

CANNON, P. M., D. G. Tenen, M. B. Feinberg, H. S. Shin et S. Kim. 1993. "Human immunodeficiency virus-1 infection of the human promyelocytic cell line HL-60: high frequency of low-level infection and effect of subsequent cell differentiation". Blood, vol. 81, p. 437-45.

CAO, X., C. A. Kozak, Y. J. Liu, M. Noguchi, E. O'Connell et W. J. Leonard. 1993. "Characterization of cDNAs encoding the murine interleukin 2 receptor (IL-2R) gamma chain: chromosomal mapping and tissue specificity of IL-2R gamma chain expression". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90, p. 8464-8.

CAO, X., E. W. Shores, J. Hu-Li, M. R. Anver, B. L. Kelsall, S. M. Russell, J. Drago, M. Noguchi, A. Grinberg, E. T. Bloom, W. E. Paul, S. I. Katz, P. E. Love et W. J. Leonard. 1995. "Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain". Immunity, vol. 2, p. 223-38.

CAPELLI, A., A. Di Stefano, M. Lusuardi, I. Gnemmi et C. F. Donner. 2002. "Increased macrophage inflammatory protein-1alpha and macrophage inflammatory protein-1beta levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients affected by different stages of pulmonary sarcoidosis". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 165, p. 236-41.

CARSON, W. E., T. A. Fehniger, S. Haldar, K. Eckhert, M. J. Lindemann, C. F. Lai, C. M. Croce, H. Baumann et M. A. Caligiuri. 1997. "A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival". Journal of Clinical Investigation, vol. 99, p. 937-43.

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.

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.

CARTWRIGHT, G. E., J. W. Athens et M. M. Wintrobe. 1964. "The kinetics of granulopoiesis in normal man". Blood, vol. 24, p. 780-803.

CARVALHO-PINTO, C. E., M. I. Garcia, M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, J. Martin-Caballero, J. Flores, C. Martinez-A et D. Balomenos. 2002. "Autocrine production of IFN-gamma by macrophages controls their recruitment to kidney and the development of glomerulonephritis in MRL/lpr mice". Journal of Immunology, vol. 169, p. 1058-67.

CASSATELLA, M. A. 1999. "Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound". Advances in Immunology, vol. 73, p. 369-509.

CASSATELLA, M. A., S. Gasperini, F. Calzetti, A. Bertagnin, A. D. Luster et P. P. McDonald. 1997. "Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils". European Journal of Immunology, vol. 27, p. 111-5.

- CASSATELLA, M. A., L. Meda, S. Gasperini, A. D'Andrea, X. Ma et G. Trinchieri. 1995. "Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes". European Journal of Immunology, vol. 25, p. 1-5.
- CASTELLI, J., E. K. Thomas, M. Gilliet, Y. J. Liu et J. A. Levy. 2004. "Mature dendritic cells can enhance CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV responses: the role of IL-15". Blood, vol. 103, p. 2699-704.
- CAVAILLON, J. M. 1994. "Cytokines and macrophages". Biomedicine and Pharmacotherapy, vol. 48, p. 445-53.
- CHATHAM, W. W., R. Swaim, H. Frohsin Jr, L. W. Heck, E. J. Miller et W. D. Blackburn Jr. 1993. "Degradation of human articular cartilage by neutrophils in synovial fluid". Arthritis and Rheumatism, vol. 36, p. 51-8.
- CHEHIMI, J., J. D. Marshall, O. Salvucci, I. Frank, S. Chehimi, S. Kawecki, D. Bacheller, S. Rifat et S. Chouaib. 1997. "IL-15 enhances immune functions during HIV infection". Journal of Immunology, vol. 158, p. 5978-87.
- CHEN, C., C. Chou, Y. Sun et W. Huang. 2001. "Tumor necrosis factor alpha-induced activation of downstream NF-kappaB site of the promoter mediates epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of PKCalpha, tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway". Cellular Signalling, vol. 13, p. 543-53.
- CHO, M. L., W. U. Kim, S. Y. Min, D. J. Min, J. K. Min, S. H. Lee, S. H. Park, C. S. Cho et H. Y. Kim. 2002. "Cyclosporine differentially regulates interleukin-10, interleukin-15, and tumor necrosis factor a production by rheumatoid synoviocytes". Arthritis and Rheumatism, vol. 46, p. 42-51.
- CHO, M. L., C. H. Yoon, S. Y. Hwang, M. K. Park, S. Y. Min, S. H. Lee, S. H. Park et H. Y. Kim. 2004. "Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts". Arthritis and Rheumatism, vol. 50, p. 776-84.
- CHOI, S. H., S. Y. Lyu et W. B. Park. 2004. "Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt". Archives of Pharmacal Research, vol. 27, p. 68-76.
- 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.
- CLARK, S. C. 1988. "Biological activities of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". International Journal of Cell Cloning, vol. 6, p. 365-77.

CLISH, C. B., J. A. O'Brien, K. Gronert, G. L. Stahl, N. A. Petasis et C. N. Serhan. 1999. "Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 8247-52.

COATES, N. J. et S. R. McColl. 2001. "Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation". Journal of Immunology, vol. 166, p. 5176-82.

COFFER, P. J., N. Geijsen, L. M'rabet, R. C. Schweizer, T. Maikoe, J. A. Raaijmakers, J. W. Lammers et L. Koenderman. 1998. "Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function". Biochemical Journal, vol. 329 (Pt 1), p. 121-30.

COLLINS, S. J. 1987. "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression". Blood, vol. 70, p. 1233-44.

COLLINS, S. J., A. Bodner, R. Ting et R. C. Gallo. 1980. "Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells". International Journal of Cancer, vol. 25, p. 213-8.

COLLINS, S. J., R. C. Gallo et R. E. Gallagher. 1977. "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture". Nature, vol. 270, p. 347-9.

COLLINS, S. J., F. W. Ruscetti, R. E. Gallagher et R. C. Gallo. 1978. "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 75, p. 2458-62.

COLOMBO, M. P., L. Lombardi, A. Stoppacciaro, C. Melani, M. Parenza, B. Bottazzi et G. Parmiani. 1992. "Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) gene transduction in murine adenocarcinoma drives neutrophil-mediated tumor inhibition in vivo. Neutrophils discriminate between G-CSF-producing and G-CSF-nonproducing tumor cells". Journal of Immunology, vol. 149, p. 113-9.

COLOTTA, F., F. Re, M. Muzio, R. Bertini, N. Polentarutti, M. Sironi, J. G. Giri, S. K. Dower, J. E. Sims et A. Mantovani. 1993. "Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4". Science, vol. 261, p. 472-5.

COLOTTA, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani et A. Mantovani. 1992. "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products". Blood, vol. 80, p. 2012-20.

COMES, A., E. Di Carlo, P. Musiani, O. Rosso, R. Meazza, C. Chiodoni, M. P. Colombo et S. Ferrini. 2002. "IFN-gamma-independent synergistic effects of IL-12 and IL-15 induce anti-tumor immune responses in syngeneic mice". European Journal of Immunology, vol. 32, p. 1914-23.

- CONSTANTINESCU, C. S., C. Grygar, L. Kappos et D. Leppert. 2001. "Interleukin 15 stimulates production of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by human peripheral blood mononuclear cells". Cytokine, vol. 13, p. 244-7.
- COOKSON, S. et D. Reen. 2003. "IL-15 drives neonatal T cells to acquire CD56 and become activated effector cells". Blood, vol. 102, p. 2195-7.
- COOPER, M. A., J. E. Bush, T. A. Fehniger, J. B. VanDeusen, R. E. Waite, Y. Liu, H. L. Aguila et M. A. Caligiuri. 2002. "In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells". Blood, vol. 100, p. 3633-8.
- CORDERO, O. J., F. J. Salgado, A. Mera-Varela et M. Nogueira. 2001. "Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis". Rheumatology International, vol. 21, p. 69-74.
- COWBURN, A. S., K. A. Cadwallader, B. J. Reed, N. Farahi et E. R. Chilvers. 2002. "Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival". Blood, vol. 100, p. 2607-16.
- CREPALDI, L., L. Silveri, F. Calzetti, C. Pinardi et M. A. Cassatella. 2002. "Molecular basis of the synergistic production of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils stimulated with IL-4 and IL-10". International Immunology, vol. 14, p. 1145-53.
- CRONSTEIN, B. N., M. C. Montesinos et G. Weissmann. 1999. "Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFkappaB". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 6377-81.
- CROSS, A., R. C. Bucknall, M. A. Cassatella, S. W. Edwards et R. J. Moots. 2003. "Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis". Arthritis and Rheumatism, vol. 48, p. 2796-806.
- CROSSLEY, L. J. 2003. "Neutrophil activation by fMLP regulates FOXO (forkhead) transcription factors by multiple pathways, one of which includes the binding of FOXO to the survival factor Mcl-1". Journal of Leukocyte Biology, vol. 74, p. 583-92.
- D'AURIA, L., C. Bonifati, P. Cordiali-Fei, G. Leone, M. Picardo, M. Pietravallo, B. Giacalone et F. Ameglio. 1999. "Increased serum interleukin-15 levels in bullous skin diseases: correlation with disease intensity". Archives for Dermatological Research. Archiv fur Dermatologische Forschung, vol. 291, p. 354-6.
- DALLEGRI, F., L. Ottonello, A. Ballestrero, P. Dapino, F. Ferrando, F. Patrone et C. Sacchetti. 1991. "Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1". Inflammation, vol. 15, p. 15-30.

DAMIA, G., K. L. Komschlies, C. R. Faltynek, F. W. Ruscetti et R. H. Wiltout. 1992. "Administration of recombinant human interleukin-7 alters the frequency and number of myeloid progenitor cells in the bone marrow and spleen of mice". Blood, vol. 79, p. 1121-9.

DANGERFIELD, J. P., S. Wang et S. Nourshargh. 2005. "Blockade of alpha6 integrin inhibits IL-1beta- but not TNF-alpha-induced neutrophil transmigration in vivo". Journal of Leukocyte Biology, vol. 77, p. 159-65.

DAWSON, J., A. D. Sedgwick, J. C. Edwards et P. Lees. 1991. "A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse". International Journal of Tissue Reactions, vol. 13, p. 171-85.

DE BRITO, F. B., D. G. Corry, A. R. Moore, D. E. Howat et D. A. Willoughby. 1988. "Polyarthritis and the air pouch reaction: dissimilarity of adjuvant and collagen models". Immunopharmacology, vol. 15, p. 123-30.

DE CREUS, A., K. Van Beneden, F. Stevenaert, V. Debacker, J. Plum et G. Leclercq. 2002. "Developmental and functional defects of thymic and epidermal V gamma 3 cells in IL-15-deficient and IFN regulatory factor-1-deficient mice". Journal of Immunology, vol. 168, p. 6486-93.

DE GENDT, C. M., L. S. De Clerck, C. H. Bridts, N. Van Osselaer et W. J. Stevens. 1996. "Relationship between interleukin-8 and neutrophil adhesion molecules in rheumatoid arthritis". Rheumatology International, vol. 16, p. 169-73.

DE JONG, J. L., N. L. Farner et P. M. Sondel. 1998. "Distinctions in lymphocyte responses to IL-2 and IL-15 reflect differential ligand binding interactions with the IL-2Rbeta chain and suggest differential roles for the IL-2Ralpha and IL-15Ralpha subunits". Cytokine, vol. 10, p. 920-30.

DE JONG, J. L., N. L. Farner, M. B. Widmer, J. G. Giri et P. M. Sondel. 1996. "Interaction of IL-15 with the shared IL-2 receptor beta and gamma c subunits. The IL-15/beta/gamma c receptor-ligand complex is less stable than the IL-2/beta/gamma c receptor-ligand complex". Journal of Immunology, vol. 156, p. 1339-48.

DELIA, D., A. Aiello, D. Soligo, E. Fontanella, C. Melani, F. Pezzella, M. A. Pierotti et G. Della Porta. 1992. "bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells". Blood, vol. 79, p. 1291-8.

DEN BROEDER, A. A., G. J. Wanten, W. J. Oyen, T. Naber, P. L. van Riel et P. Barrera. 2003. "Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis". Journal of Rheumatology, vol. 30, p. 232-7.

- DEROUET, M., L. Thomas, A. Cross, R. J. Moots et S. W. Edwards. 2004. "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1". Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 26915-21.
- DI CARLO, E., A. Comes, S. Basso, A. De Ambrosis, R. Meazza, P. Musiani, K. Moelling, A. Albini et S. Ferrini. 2000. "The combined action of IL-15 and IL-12 gene transfer can induce tumor cell rejection without T and NK cell involvement". Journal of Immunology, vol. 165, p. 3111-8.
- DI CARLO, E., A. Comes, A. M. Orengo, O. Rosso, R. Meazza, P. Musiani, M. P. Colombo et S. Ferrini. 2004. "IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN-gamma-dependent CXC chemokines in syngeneic mice". Journal of Immunology, vol. 172, p. 1540-7.
- DI CARLO, E., G. Forni, P. Lollini, M. P. Colombo, A. Modesti et P. Musiani. 2001. "The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions". Blood, vol. 97, p. 339-45.
- DI CARLO, E., G. Forni et P. Musiani. 2003. "Neutrophils in the antitumoral immune response". Chem Immunol Allergy, vol. 83, p. 182-203.
- DI CARLO, E., R. Meazza, S. Basso, O. Rosso, A. Comes, A. Gaggero, P. Musiani, L. Santi et S. Ferrini. 2000. "Dissimilar anti-tumour reactions induced by tumour cells engineered with the interleukin-2 or interleukin-15 gene in nude mice". Journal of Pathology, vol. 191, p. 193-201.
- DIBBERT, B., M. Weber, W. H. Nikolaizik, P. Vogt, M. H. Schoni, K. Blaser et H. U. Simon. 1999. "Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 13330-5.
- DIETRICH, J. B., G. Ribereau-Gayon, M. L. Jung, H. Franz, J. P. Beck et R. Anton. 1992. "Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins". Anti-Cancer Drugs, vol. 3, p. 507-11.
- DISANTO, J. P., W. Muller, D. Guy-Grand, A. Fischer et K. Rajewsky. 1995. "Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 377-81.
- DISTLER, J. H., A. Jungel, O. Kowal-Bielecka, B. A. Michel, R. E. Gay, H. Sprott, M. Matucci-Cerinic, M. Chilla, K. Reich, J. R. Kalden, U. Muller-Ladner, H. M. Lorenz, S. Gay et O. Distler. 2005. "Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis". Arthritis and Rheumatism, vol. 52, p. 856-64.

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.

DOERSCHUK, C. M. 2001. "Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs". Microcirculation, vol. 8, p. 71-88.

DOHERTY, T. M., R. A. Seder et A. Sher. 1996. "Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages". Journal of Immunology, vol. 156, p. 735-41.

DOUCET, C., R. Meazza, C. Pottin-Clemenceau, M. Scudeletti, D. Brouty-Boye, S. Ferrini, A. Alileche, Y. Taoufik, C. Jasmin, B. Azzarone et F. Indiveri. 1997. "Role of interleukin (IL)-2 and IL-15 in the tumour progression of a melanoma cell line MELP, derived from an IL-2 progressor patient". Melanoma Research, vol. 7 Suppl 2, p. S7-17.

DRENT, M., J. A. Jacobs, J. de Vries, R. J. Lamers, I. H. Liem et E. F. Wouters. 1999. "Does the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile reflect the severity of sarcoidosis?". European Respiratory Journal, vol. 13, p. 1338-44.

DUBOIS, S., F. Magrangeas, P. Lehours, S. Raheer, J. Bernard, O. Boisteau, S. Leroy, S. Minvielle, A. Godard et Y. Jacques. 1999. "Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 26978-84.

DUBOIS, S., J. Mariner, T. A. Waldmann et Y. Tagaya. 2002. "IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells". Immunity, vol. 17, p. 537-47.

DUBRAVEC, D. B., D. R. Spriggs, J. A. Mannick et M. L. Rodrick. 1990. "Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, p. 6758-61.

EBERL, M., B. Altincicek, A. K. Kollas, S. Sanderbrand, U. Bahr, A. Reichenberg, E. Beck, D. Foster, J. Wiesner, M. Hintz et H. Jomaa. 2002a. "Accumulation of a potent gammadelta T-cell stimulator after deletion of the *lytB* gene in *Escherichia coli*". Immunology, vol. 106, p. 200-11.

EBERL, M., R. Engel, E. Beck et H. Jomaa. 2002b. "Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes". Cellular Immunology, vol. 218, p. 1-6.

EBERT, E. C. 2005. "IL-15 converts human intestinal intraepithelial lymphocytes to CD94 producers of IFN-gamma and IL-10, the latter promoting Fas ligand-mediated cytotoxicity". Immunology, vol. 115, p. 118-26.

- EDELBAUM, D., M. Mohamadzadeh, P. R. Bergstresser, K. Sugamura et A. Takashima. 1995. "Interleukin (IL)-15 promotes the growth of murine epidermal gamma delta T cells by a mechanism involving the beta- and gamma c-chains of the IL-2 receptor". Journal of Investigative Dermatology, vol. 105, p. 837-43.
- EDWARDS, J. C., A. D. Sedgwick et D. A. Willoughby. 1981. "The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system". Journal of Pathology, vol. 134, p. 147-56.
- EDWARDS, M. J., F. N. Miller, D. E. Sims, D. L. Abney, D. A. Schuschke et T. S. Corey. 1992. "Interleukin 2 acutely induces platelet and neutrophil-endothelial adherence and macromolecular leakage". Cancer Research, vol. 52, p. 3425-31.
- EDWARDS, S. W. 1994. Biochemistry and physiology of the neutrophil. New York : Cambridge University Press, 299 p.
- EDWARDS, S. W. et M. B. Hallett. 1997. "Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis". Immunology Today, vol. 18, p. 320-4.
- EDWARDS, S. W., C. S. Holden, J. M. Humphreys et C. A. Hart. 1989. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) primes the respiratory burst and stimulates protein biosynthesis in human neutrophils". FEBS Letters, vol. 256, p. 62-6.
- EICHER, D. M. 2003. "IL-2 and IL-15 manifest opposing effects on activation of nuclear factor of activated T cells". Cellular Immunology, vol. 223, p. 133-42.
- EICHER, D. M. et T. A. Waldmann. 1998. "IL-2R alpha on one cell can present IL-2 to IL-2R beta/gamma(c) on another cell to augment IL-2 signaling". Journal of Immunology, vol. 161, p. 5430-7.
- EL-BENNA, J., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidallo et C. Elbim. 2005. "Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses". Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, vol. 53, p. 199-206.
- ELEWAUT, D. et M. Kronenberg. 2000. "Molecular biology of NK T cell specificity and development". Seminars in Immunology, vol. 12, p. 561-8.
- ELLIOTT, M. J., R. N. Maini, M. Feldmann, J. R. Kalden, C. Antoni, J. S. Smolen, B. Leeb, F. C. Breedveld, J. D. Macfarlane, H. Bijl et J. N. Woody. 1994a. "Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis". Lancet, vol. 344, p. 1105-10.
- ELLIOTT, M. J., R. N. Maini, M. Feldmann, A. Long-Fox, P. Charles, H. Bijl et J. N. Woody. 1994b. "Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis". Lancet, vol. 344, p. 1125-7.
- ELLIS, T. N. et B. L. Beaman. 2004. "Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function". Immunology, vol. 112, p. 2-12.

ELLOSO, M. M., M. Wallace, D. D. Manning et W. P. Weidanz. 1998. "The effects of interleukin-15 on human gammadelta T cell responses to Plasmodium falciparum in vitro". Immunology Letters, vol. 64, p. 125-32.

ENDO, H., T. Akahoshi, K. Takagishi, S. Kashiwazaki et K. Matsushima. 1991. "Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints". Lymphokine and Cytokine Research, vol. 10, p. 245-52.

ENDO, Y., K. Tsurugi et H. Franz. 1988. "The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein". FEBS Letters, vol. 231, p. 378-80.

ENNIS, M. 2003. "Neutrophils in asthma pathophysiology". Curr Allergy Asthma Rep, vol. 3, p. 159-65.

ENTHAMMER, C., R. Zambello, L. Trentin, A. Cerutti, A. Milani, P. Bulian, A. Cipriani, S. Garbisa, C. Agostini et G. Semenzato. 1993. "Synthesis and release of granulocyte--macrophage colony--stimulating factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis". Sarcoidosis, vol. 10, p. 147-8.

EPLING-BURNETTE, P. K., J. H. Liu, R. Catlett-Falcone, J. Turkson, M. Oshiro, R. Kothapalli, Y. Li, J. M. Wang, H. F. Yang-Yen, J. Karras, R. Jove et T. P. Loughran Jr. 2001a. "Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression". Journal of Clinical Investigation, vol. 107, p. 351-62.

EPLING-BURNETTE, P. K., B. Zhong, F. Bai, K. Jiang, R. D. Bailey, R. Garcia, R. Jove, J. Y. Djeu, T. P. Loughran Jr et S. Wei. 2001b. "Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils". Journal of Immunology, vol. 166, p. 7486-95.

ERBECK, K., J. B. Klein et K. R. McLeish. 1993. "Differential uncoupling of chemoattractant receptors from G proteins in retinoic acid-differentiated HL-60 granulocytes". Journal of Immunology, vol. 150, p. 1913-21.

ETHUIN, F., B. Gerard, J. E. Benna, A. Boutten, M. A. Gougereot-Pocidallo, L. Jacob et S. Chollet-Martin. 2004. "Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12". Laboratory Investigation, vol. 84, p. 1363-71.

FADEEL, B., A. Ahlin, J. I. Henter, S. Orrenius et M. B. Hampton. 1998. "Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species". Blood, vol. 92, p. 4808-18.

FADEEL, B. et V. E. Kagan. 2003. "Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils: regulation by reactive oxygen species". Redox Rep, vol. 8, p. 143-50.

FADOK, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott et P. M. Henson. 1998. "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF". Journal of Clinical Investigation, vol. 101, p. 890-8.

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.

FALTYNEK, C. R., S. Wang, D. Miller, E. Young, L. Tiberio, K. Kross, M. Kelley et E. Kloszewski. 1992. "Administration of human recombinant IL-7 to normal and irradiated mice increases the numbers of lymphocytes and some immature cells of the myeloid lineage". Journal of Immunology, vol. 149, p. 1276-82.

FAWAZ, L. M., E. Sharif-Askari et J. Menezes. 1999. "Up-regulation of NK cytotoxic activity via IL-15 induction by different viruses: a comparative study". Journal of Immunology, vol. 163, p. 4473-80.

FEHNIGER, T. A. et M. A. Caligiuri. 2001. "Interleukin 15: biology and relevance to human disease". Blood, vol. 97, p. 14-32.

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.

FEHNIGER, T. A., K. Suzuki, A. Ponnappan, J. B. VanDeusen, M. A. Cooper, S. M. Florea, A. G. Freud, M. L. Robinson, J. Durbin et M. A. Caligiuri. 2001. "Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 193, p. 219-31.

FERLAZZO, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta et C. Munz. 2004. "Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, p. 16606-11.

FERRARI-LACRAZ, S., E. Zanelli, M. Neuberg, E. Donskoy, Y. S. Kim, X. X. Zheng, W. W. Hancock, W. Maslinski, X. C. Li, T. B. Strom et T. Moll. 2004. "Targeting IL-15 receptor-bearing cells with an antagonist mutant IL-15/Fc protein prevents disease development and progression in murine collagen-induced arthritis". Journal of Immunology, vol. 173, p. 5818-26.

FERRETTI, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones et A. Trifilieff. 2003. "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger". Journal of Immunology, vol. 170, p. 2106-12.

FISCHKOFF, S. A., A. Pollak, G. J. Gleich, J. R. Testa, S. Misawa et T. J. Reber. 1984. "Eosinophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60". Journal of Experimental Medicine, vol. 160, p. 179-96.

FOLKESSON, H. G. et M. A. Matthay. 1997. "Inhibition of CD18 or CD11b attenuates acute lung injury after acid instillation in rabbits". Journal of Applied Physiology, vol. 82, p. 1743-50.

FORREST, M. J., V. Zammit et P. M. Brooks. 1988. "Inhibition of leucotriene B4 synthesis by BW 755c does not reduce polymorphonuclear leucocyte (PMNL) accumulation induced by monosodium urate crystals". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 47, p. 241-6.

FOSSAT, C., D. Sainty, A. M. Stoppa, D. Blaise, M. David, D. Maraninchi et I. Juhan-Vague. 1993. "In vitro inhibition of interleukin-2-induced defective polymorphonuclear chemotaxis by TNF inhibitor". European Journal of Haematology, vol. 51, p. 13-7.

FRASCH, S. C., J. A. Nick, V. A. Fadok, D. L. Bratton, G. S. Worthen et P. M. Henson. 1998. "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 8389-97.

FULOP, T. Jr, A. Larbi, A. Linteau, S. Desgeorges et N. Douziech. 2002. "The role of Mcl-1 and Bax expression alteration in the decreased rescue of human neutrophils from apoptosis by GM-CSF with aging". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 973, p. 305-8.

FURLONG, I. J., R. Ascaso, A. Lopez Rivas et M. K. Collins. 1997. "Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity". Journal of Cell Science, vol. 110 (Pt 5), p. 653-61.

FURMANCZYK, P. S. et L. S. Quinn. 2003. "Interleukin-15 increases myosin accretion in human skeletal myogenic cultures". Cell Biology International, vol. 27, p. 845-51.

GABIUS, H. J., H. Walzel, S. S. Joshi, J. Kruij, S. Kojima, V. Gerke, H. Kratzin et S. Gabius. 1992. "The immunomodulatory beta-galactoside-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells". Anticancer Research, vol. 12, p. 669-75.

GADINA, M., C. Sudarshan, R. Visconti, Y. J. Zhou, H. Gu, B. G. Neel et J. J. O'Shea. 2000. "The docking molecule gab2 is induced by lymphocyte activation and is involved in signaling by interleukin-2 and interleukin-15 but not other common gamma chain-using cytokines". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 26959-66.

GAGGERO, A., B. Azzarone, C. Andrei, Z. Mishal, R. Meazza, E. Zappia, A. Rubartelli et S. Ferrini. 1999. "Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms". European Journal of Immunology, vol. 29, p. 1265-74.

GALLAGHER, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti et R. Gallo. 1979. "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia". Blood, vol. 54, p. 713-33.

GALLEGOS, A. M. et M. J. Bevan. 2004. "Driven to autoimmunity: the nod mouse". Cell, vol. 117, p. 149-51.

GASPERINI, S., F. Calzetti, M. P. Russo, M. De Gironcoli et M. A. Cassatella. 1995. "Regulation of GRO alpha production in human granulocytes". Journal of Inflammation, vol. 45, p. 143-51.

GASPERINI, S., M. Marchi, F. Calzetti, C. Laudanna, L. Vicentini, H. Olsen, M. Murphy, F. Liao, J. Farber et M. A. Cassatella. 1999. "Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils". Journal of Immunology, vol. 162, p. 4928-37.

GE, N., Y. Nishioka, Y. Nakamura, Y. Okano, K. Yoneda, H. Ogawa, A. Sugita, H. Yanagawa et S. Sone. 2004. "Synthesis and secretion of interleukin-15 by freshly isolated human bronchial epithelial cells". International Archives of Allergy and Immunology, vol. 135, p. 235-42.

GEISER, T., B. Dewald, M. U. Ehrenguber, I. Clark-Lewis et M. Baggiolini. 1993. "The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 15419-24.

GERRITSEN, M. E., K. A. Kelley, G. Ligon, C. A. Perry, C. P. Shen, A. Szczepanski et W. W. Carley. 1993. "Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium". Arthritis and Rheumatism, vol. 36, p. 593-602.

GIANCOTTI, F. G. et E. Ruoslahti. 1999. "Integrin signaling". Science, vol. 285, p. 1028-32.

GIJSBERS, K., M. Gouwy, S. Struyf, A. Wuyts, P. Proost, G. Opdenakker, F. Penninckx, N. Ectors, K. Geboes et J. Van Damme. 2005. "GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors". Experimental Cell Research, vol. 303, p. 331-42.

GILL, N., K. L. Rosenthal et A. A. Ashkar. 2005. "NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection". Journal of Virology, vol. 79, p. 4470-8.

GILMOUR, K. C., H. Fujii, T. Cranston, E. G. Davies, C. Kinnon et H. B. Gaspar. 2001. "Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency". Blood, vol. 98, p. 877-9.

GIRARD, D. 2003. "Phenotypic and functional change of neutrophils activated by cytokines utilizing the common cytokine receptor gamma chain". Chem Immunol Allergy, vol. 83, p. 64-80.

GIRARD, D. et A. D. Beaulieu. 1997. "Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that gamma(c) expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses". Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 83, p. 264-71.

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.

GIRARD, D., J. Gosselin, D. Heitz, R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1995. "Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils". Blood, vol. 86, p. 1170-6.

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.

GIRARD, D., R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1997. "Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis". Biochemical Journal, vol. 325 (Pt 1), p. 147-53.

GIRGIS, R. E., M. A. Basha, M. Maliarik, J. Popovich Jr et M. C. Iannuzzi. 1995. "Cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary sarcoidosis". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 152, p. 71-5.

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.

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.

GIRON-MICHEL, J., A. Caignard, M. Fogli, D. Brouty-Boye, D. Briard, M. van Dijk, R. Meazza, S. Ferrini, C. Lebousse-Kerdiles, D. Clay, H. Bompais, S. Chouaib, B. Peault et B. Azzarone. 2003. "Differential STAT3, STAT5, and NF-kappaB activation in human hematopoietic progenitors by endogenous interleukin-15: implications in the expression of functional molecules". Blood, vol. 102, p. 109-17.

GIRON-MICHEL, J., M. Giuliani, M. Fogli, D. Brouty-Boye, S. Ferrini, F. Baychelier, P. Eid, C. Lebousse Kerdiles, D. Durali, R. Biassoni, B. Charpentier, A. Vasquez, S. Chouaib, A. Caignard, L. Moretta et B. Azzarone. 2005. "Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15R{alpha} complexes display differential signalling and functions on human haematopoietic progenitors". Blood, vol.

GNARRA, J. R., H. Otani, M. G. Wang, O. W. McBride, M. Sharon et W. J. Leonard. 1990. "Human interleukin 2 receptor beta-chain gene: chromosomal localization and identification of 5' regulatory sequences". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, p. 3440-4.

GOLDRATH, A. W., P. V. Sivakumar, M. Glaccum, M. K. Kennedy, M. J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis et E. A. Butz. 2002. "Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 195, p. 1515-22.

GONZALEZ-ALVARO, I., A. M. Ortiz, R. Garcia-Vicuna, A. Balsa, D. Pascual-Salcedo et A. Laffon. 2003. "Increased serum levels of interleukin-15 in rheumatoid arthritis with long- term disease". Clinical and Experimental Rheumatology, vol. 21, p. 639-42.

GORTER, R. W., M. van Wely, M. Stoss et U. Wollina. 1998. "Subcutaneous infiltrates induced by injection of mistletoe extracts (Iscador)". American Journal of Therapeutics, vol. 5, p. 181-7.

GOSSELIN, J., A. TomoIu, 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.

GOTTLIEB, R. A., H. A. Giesing, R. L. Engler et B. M. Babior. 1995a. "The acid deoxyribonuclease of neutrophils: a possible participant in apoptosis-associated genome destruction". Blood, vol. 86, p. 2414-8.

GOTTLIEB, R. A., H. A. Giesing, J. Y. Zhu, R. L. Engler et B. M. Babior. 1995b. "Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H(+)-ATPase". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 5965-8.

GRABSTEIN, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh, L. Johnson, M. R. Alderson, J. D. Watson, D. M. Anderson et J. G. Giri. 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.

GRACIE, J. A., R. J. Forsey, W. L. Chan, A. Gilmour, B. P. Leung, M. R. Greer, K. Kennedy, R. Carter, X. Q. Wei, D. Xu, M. Field, A. Foulis, F. Y. Liew et I. B. McInnes. 1999. "A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis". Journal of Clinical Investigation, vol. 104, p. 1393-401.

GRAVISACO, M. J., C. Mongini, E. Alvarez, P. Ruybal, A. Escalada, M. Sanchez-Lockhart, S. Hajos et C. Waldner. 2003. "IL-2, IL-10, IL-15 and TNF are key regulators of murine T-cell lymphoma growth". International Journal of Molecular Medicine, vol. 12, p. 627-32.

GRIFFIN, J., D. Munroe, P. Major et D. Kufe. 1982. "Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis". Experimental Hematology, vol. 10, p. 774-81.

GROSSMAN, W. J., J. W. Verbsky, L. Yang, L. J. Berg, L. E. Fields, D. D. Chaplin et L. Ratner. 1999. "Dysregulated myelopoiesis in mice lacking Jak3". Blood, vol. 94, p. 932-9.

GROTENDORST, G. R., G. Smale et D. Pancev. 1989. "Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils". Journal of Cellular Physiology, vol. 140, p. 396-402.

GRZEGORZEWSKI, K., K. L. Komschlies, M. Mori, K. Kaneda, N. Usui, C. R. Faltynek, J. R. Keller, F. W. Ruscetti et R. H. Wiltrout. 1994. "Administration of recombinant human interleukin-7 to mice induces the exportation of myeloid progenitor cells from the bone marrow to peripheral sites". Blood, vol. 83, p. 377-85.

GUENTER, C. A., J. J. Coalson et J. Jacques. 1981. "Emphysema associated with intravascular leukocyte sequestration. Comparison with papain-induced emphysema". American Review of Respiratory Disease, vol. 123, p. 79-84.

HABIB, T., A. Nelson et K. Kaushansky. 2003. "IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 112, p. 1033-45.

HABIB, T., S. Senadheera, K. Weinberg et K. Kaushansky. 2002. "The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3". Biochemistry, vol. 41, p. 8725-31.

HAC, S., M. Dobosz, J. Kaczor et R. Rzepko. 2004. "Influence of molecule CD 11b blockade on the course of acute ceruleine pancreatitis in rats". Experimental and Molecular Pathology, vol. 77, p. 57-65.

HACHICHA, M., M. Pouliot, N. A. Petasis et C. N. Serhan. 1999. "Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1alpha-initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis". Journal of Experimental Medicine, vol. 189, p. 1923-30.

HAJTO, T., K. Hostanska, J. Fischer et R. Saller. 1997. "Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity". Anti-Cancer Drugs, vol. 8 Suppl 1, p. S43-6.

HAJTO, T., K. Hostanska, K. Frei, C. Rordorf et H. J. Gabius. 1990. "Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract". Cancer Research, vol. 50, p. 3322-6.

HAJTO, T., K. Hostanska et H. J. Gabius. 1989. "Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients". Cancer Research, vol. 49, p. 4803-8.

HAJTO, T., K. Hostanska, K. Weber, H. Zinke, J. Fischer, U. Mengers, H. Lentzen et R. Saller. 1998. "Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo". Natural Immunity, vol. 16, p. 34-46.

HAMBLETON, P. et P. Miller. 1988. "Studies on immunological air pouch inflammation in the rat". International Archives of Allergy and Applied Immunology, vol. 87, p. 70-5.

HAMID, Q., M. K. Tulic', M. C. Liu et R. Moqbel. 2003. "Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 111, p. S5-S12; discussion S12-7.

HANISCH, U. K., S. A. Lyons, M. Prinz, C. Nolte, J. R. Weber, H. Kettenmann et F. Kirchhoff. 1997. "Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 28853-60.

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.

HARRIS, P. et P. Ralph. 1985. "Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines". Journal of Leukocyte Biology, vol. 37, p. 407-22.

HART, S. P., J. A. Ross, K. Ross, C. Haslett et I. Dransfield. 2000. "Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes". Cell Death and Differentiation, vol. 7, p. 493-503.

HARTER, L., L. Mica, R. Stocker, O. Trentz et M. Keel. 2003. "Mcl-1 correlates with reduced apoptosis in neutrophils from patients with sepsis". Journal of the American College of Surgeons, vol. 197, p. 964-73.

HARTMANN, P., C. Franzen, A. Rubbert, J. Rogowski, M. Kailus et B. Salzberger. 2005. "Blockade of TNF does not alter oxygen burst and phagocytosis of human neutrophils in patients with rheumatoid arthritis". Immunobiology, vol. 209, p. 669-79.

HASEGAWA, T., K. Suzuki, C. Sakamoto, K. Ohta, S. Nishiki, M. Hino, N. Tatsumi et S. Kitagawa. 2003. "Expression of the inhibitor of apoptosis (IAP) family members in human neutrophils: up-regulation of cIAP2 by granulocyte colony-stimulating factor and overexpression of cIAP2 in chronic neutrophilic leukemia". Blood, vol. 101, p. 1164-71.

HASS, R., M. Brach, H. Gunji, S. Kharbanda et D. Kufe. 1992. "Inhibition of EGR-1 and NF-kappa B gene expression by dexamethasone during phorbol ester-induced human monocytic differentiation". Biochemical Pharmacology, vol. 44, p. 1569-76.

HATTORI, M., H. Okazaki, Y. Ishida, M. Onuma, S. Kano, T. Honjo et N. Minato. 1990. "Expression of murine IL-2 receptor beta-chain on thymic and splenic lymphocyte subpopulations as revealed by the IL-2-induced proliferative response in human IL-2 receptor alpha-chain transgenic mice". Journal of Immunology, vol. 144, p. 3809-15.

HAUERT, A. B., S. Martinelli, C. Marone et V. Niggli. 2002. "Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis". International Journal of Biochemistry and Cell Biology, vol. 34, p. 838-54.

HAZAMA, S., T. Noma, F. Wang, N. Iizuka, Y. Ogura, K. Yoshimura, E. Inoguchi, M. Hakozaki, K. Hirose, T. Suzuki et M. Oka. 1999. "Tumour cells engineered to secrete interleukin-15 augment anti-tumour immune responses in vivo". British Journal of Cancer, vol. 80, p. 1420-6.

HENRY, M. T., K. McMahon, A. J. Mackarel, K. Prikk, T. Sorsa, P. Maisi, R. Sepper, M. X. Fitzgerald et C. M. O'Connor. 2002. "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF". European Respiratory Journal, vol. 20, p. 1220-7.

HIROI, T., M. Yanagita, N. Ohta, G. Sakaue et H. Kiyono. 2000. "IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses". Journal of Immunology, vol. 165, p. 4329-37.

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.

HOONTRAKOON, R., H. W. Chu, S. J. Gardai, S. E. Wenzel, P. McDonald, V. A. Fadok, P. M. Henson et D. L. Bratton. 2002. "Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 26, p. 404-12.

HOSTANSKA, K., T. Hajto, G. C. Spagnoli, J. Fischer, H. Lentzen et R. Herrmann. 1995. "A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells". Natural Immunity, vol. 14, p. 295-304.

HOSTANSKA, K., T. Hajto, K. Weber, J. Fischer, H. Lentzen, B. Sutterlin et R. Saller. 1996-1997. "A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes". Natural Immunity, vol. 15, p. 295-311.

HUA, J., T. Hasebe, A. Someya, S. Nakamura, K. Sugimoto et I. Nagaoka. 2000. "Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 cells to neutrophil lineage". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 216-24.

HUBER, D., M. S. Balda et K. Matter. 1998-1999. "Transepithelial migration of neutrophils". Invasion and Metastasis, vol. 18, p. 70-80.

HUBERMAN, E. et M. F. Callaham. 1979. "Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 76, p. 1293-7.

HUNNINGHAKE, G. W. 1984. "Release of interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis". American Review of Respiratory Disease, vol. 129, p. 569-72.

HWANG, S. Y. et H. Y. Kim. 2005. "Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients". Molecules and Cells, vol. 19, p. 180-4.

HWANG, S. Y., J. Y. Kim, K. W. Kim, M. K. Park, Y. Moon, W. U. Kim et H. Y. Kim. 2004. "IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways". Arthritis Res Ther, vol. 6, p. R120-8.

IIDA, M., K. Watanabe, M. Tsurufuji, K. Takaishi, Y. Iizuka et S. Tsurufuji. 1992. "Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats". Infection and Immunity, vol. 60, p. 1268-72.

IKING-KONERT, C., B. Ostendorf, O. Sander, M. Jost, C. Wagner, L. Joosten, M. Schneider et M. G. Haensch. 2005. "Trans-Differentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells in the synovial fluid in Rheumatoid Arthritis: evidence for activation by T-cells". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 64, p. 1436-42.

IMADA, K., E. T. Bloom, H. Nakajima, J. A. Horvath-Arcidiacono, G. B. Udy, H. W. Davey et W. J. Leonard. 1998. "Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity". Journal of Experimental Medicine, vol. 188, p. 2067-74.

- INAGAKI-OHARA, K., H. Nishimura, A. Mitani et Y. Yoshikai. 1997. "Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice". European Journal of Immunology, vol. 27, p. 2885-91.
- ISHIMITSU, R., H. Nishimura, T. Yajima, T. Watase, H. Kawauchi et Y. Yoshikai. 2001. "Overexpression of IL-15 in vivo enhances Tc1 response, which inhibits allergic inflammation in a murine model of asthma". Journal of Immunology, vol. 166, p. 1991-2001.
- ISSEKUTZ, A. C., A. Meager, I. Otterness et T. B. Issekutz. 1994. "The role of tumour necrosis factor-alpha and IL-1 in polymorphonuclear leucocyte and T lymphocyte recruitment to joint inflammation in adjuvant arthritis". Clinical and Experimental Immunology, vol. 97, p. 26-32.
- JABLONS, D., E. Bolton, S. Mertins, M. Rubin, P. Pizzo, S. A. Rosenberg et M. T. Lotze. 1990. "IL-2-based immunotherapy alters circulating neutrophil Fc receptor expression and chemotaxis". Journal of Immunology, vol. 144, p. 3630-6.
- JABLONSKA, E. et M. Marcinczyk. 2003. "Role of interleukin-15 and interleukin-18 in the secretion of sIL-6R and sgp130 by human neutrophils". Mediators of Inflammation, vol. 12, p. 179-83.
- JABLONSKA, E., M. Marcinczyk, A. Izycka et T. Hermanowska-Szpakowicz. 2003a. "Effect of interleukin 15 on the PMN activity in Lyme borreliosis". Polski Merkurusz Lekarski, vol. 15, p. 249-52.
- JABLONSKA, E., M. Marcinczyk, L. Talarek, S. Pancewicz, T. Hermanowska-Szpakowicz et J. Jablonski. 2003b. "IL-15 in the culture supernatants of PMN and PBMC and the serum of patients with Lyme disease". Roczniki Akademii Medycznej W Bialymstoku, vol. 48, p. 78-81.
- JABLONSKA, E., L. Piotrowski, M. Kiluk, J. Jablonski, Z. Grabowska et W. Markiewicz. 2001. "Effect of IL-15 on the secretion of IL-1beta, IL-1Ra and sIL-1RII by PMN from cancer patients". Cytokine, vol. 16, p. 173-7.
- JABLONSKA, E., W. Puzewska, M. Marcinczyk, Z. Grabowska et J. Jablonski. 2005. "iNOS expression and NO production by neutrophils in cancer patients". Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, vol. 53, p. 175-9.
- JACOBS, J. A., E. I. De Brauwier, E. I. Cornelissen et M. Drent. 2000. "Correlation of leukocyte esterase detection by reagent strips and the presence of neutrophils: a study in BAL fluid". Chest, vol. 118, p. 1450-4.
- JAMESON, J. M., L. L. Sharp, D. A. Witherden et W. L. Havran. 2004. "Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells". Frontiers in Bioscience, vol. 9, p. 2640-51.

- JARAMILLO, M., I. Plante, N. Ouellet, K. Vandal, P. A. Tessier et M. Olivier. 2004. "Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection". Journal of Immunology, vol. 172, p. 3101-10.
- JIN, H., R. Carrio, A. Yu et T. R. Malek. 2004. "Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis". Journal of Immunology, vol. 173, p. 657-65.
- JOHNSON, J. L., E. E. Moore, D. Y. Tamura, G. Zallen, W. L. Biffl et C. C. Silliman. 1998. "Interleukin-6 augments neutrophil cytotoxic potential via selective enhancement of elastase release". Journal of Surgical Research, vol. 76, p. 91-4.
- 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 J. J. O'Shea. 1995a. "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.
- JOHNSTON, J. A., L. M. Wang, E. P. Hanson, X. J. Sun, M. F. White, S. A. Oakes, J. H. Pierce et J. J. O'Shea. 1995b. "Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 28527-30.
- 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.
- JOSHI, P. C., X. Zhou, M. Cuchens et Q. Jones. 2001. "Prostaglandin E2 suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common gamma-chain". Journal of Immunology, vol. 166, p. 885-91.
- JOZSEF, L., T. Khreiss et J. G. Filep. 2004. "CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes". FASEB Journal, vol. 18, p. 1776-8.
- JUDGE, A. D., X. Zhang, H. Fujii, C. D. Surh et J. Sprent. 2002. "Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 196, p. 935-46.
- JUNGEL, A., J. H. Distler, M. Kurowska-Stolarska, C. A. Seemayer, R. Seibl, A. Forster, B. A. Michel, R. E. Gay, F. Emmrich, S. Gay et O. Distler. 2004. "Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis". Arthritis and Rheumatism, vol. 50, p. 1468-76.

KAJITANI, H., H. Enokihara, S. Tsunogake, N. Takano, K. Saito, S. Furusawa, H. Shishido, T. Noma, A. Shimizu et T. Honjo. 1989. "Effect of human recombinant interleukin 4 on in vitro granulopoiesis of human bone marrow cells". Growth Factors, vol. 1, p. 283-6.

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.

KANEGANE, H. et G. Tosato. 1996. "Activation of naive and memory T cells by interleukin-15". Blood, vol. 88, p. 230-5.

KAO, R. C., N. G. Wehner, K. M. Skubitz, B. H. Gray et J. R. Hoidal. 1988. "Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters". Journal of Clinical Investigation, vol. 82, p. 1963-73.

KASAHARA, Y., K. Iwai, A. Yachie, K. Ohta, A. Konno, H. Seki, T. Miyawaki et N. Taniguchi. 1997. "Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils". Blood, vol. 89, p. 1748-53.

KASAIAN, M. T., M. J. Whitters, L. L. Carter, L. D. Lowe, J. M. Jussif, B. Deng, K. A. Johnson, J. S. Witek, M. Senices, R. F. Konz, A. L. Wurster, D. D. Donaldson, M. Collins, D. A. Young et M. J. Grusby. 2002. "IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity". Immunity, vol. 16, p. 559-69.

KASAMA, T., R. M. Strieter, N. W. Lukacs, M. D. Burdick et S. L. Kunkel. 1994. "Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10". Journal of Immunology, vol. 152, p. 3559-69.

KASAMA, T., R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick et S. L. Kunkel. 1993. "Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha". Journal of Experimental Medicine, vol. 178, p. 63-72.

KASYAPA, C. S., C. L. Stentz, M. P. Davey et D. W. Carr. 1999. "Regulation of IL-15-stimulated TNF-alpha production by rolipram". Journal of Immunology, vol. 163, p. 2836-43.

KATO, A., H. Yoshidome, M. J. Edwards et A. B. Lentsch. 2000. "Reduced hepatic ischemia/reperfusion injury by IL-4: potential anti-inflammatory role of STAT6". Inflammation Research, vol. 49, p. 275-9.

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.

- KETTRITZ, R., M. L. Gaido, H. Haller, F. C. Luft, C. J. Jennette et R. J. Falk. 1998. "Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils". Kidney International, vol. 53, p. 84-91.
- KHAN, I. A. et L. Casciotti. 1999. "IL-15 prolongs the duration of CD8+ T cell-mediated immunity in mice infected with a vaccine strain of *Toxoplasma gondii*". Journal of Immunology, vol. 163, p. 4503-9.
- KHREISS, T., L. Jozsef, J. S. Chan et J. G. Filep. 2004. "Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils". Cellular Signalling, vol. 16, p. 801-10.
- KIM, C. H., K. H. Lee, C. T. Lee, Y. W. Kim, S. K. Han, Y. S. Shim et C. G. Yoo. 2004. "Aggregation of beta2 integrins activates human neutrophils through the I κ B/NF- κ B pathway". Journal of Leukocyte Biology, vol. 75, p. 286-92.
- KIM, H. P., L. L. Korn, A. M. Gamero et W. J. Leonard. 2005a. "Calcium Dependent Activation of IL-21 Gene Expression in T Cells". Journal of Biological Chemistry, vol.
- KIM, K. W., M. L. Cho, M. K. Park, C. H. Yoon, S. H. Park, S. H. Lee et H. Y. Kim. 2005b. "Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor kappaB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis". Arthritis Res Ther, vol. 7, p. R139-48.
- KIM, W. H., W. B. Park, B. Gao et M. H. Jung. 2004. "Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells". Molecular Pharmacology, vol. 66, p. 1383-96.
- KING, C., A. Ilic, K. Koelsch et N. Sarvetnick. 2004. "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity". Cell, vol. 117, p. 265-77.
- 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.
- KISHIDA, T., H. Asada, Y. Itokawa, F. D. Cui, M. Shin-Ya, S. Gojo, K. Yasutomi, Y. Ueda, H. Yamagishi, J. Imanishi et O. Mazda. 2003. "Interleukin (IL)-21 and IL-15 genetic transfer synergistically augments therapeutic antitumor immunity and promotes regression of metastatic lymphoma". Mol Ther, vol. 8, p. 552-8.
- 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.

KLEBANOFF, C. A., S. E. Finkelstein, D. R. Surman, M. K. Lichtman, L. Gattinoni, M. R. Theoret, N. Grewal, P. J. Spiess, P. A. Antony, D. C. Palmer, Y. Tagaya, S. A. Rosenberg, T. A. Waldmann et N. P. Restifo. 2004. "IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, p. 1969-74.

KLEBANOFF, S. J., S. Olszowski, W. C. Van Voorhis, J. A. Ledbetter, A. M. Waltersdorph et K. G. Schlechte. 1992. "Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage". Blood, vol. 80, p. 225-34.

KLEBANOFF, S. J., M. A. Vadas, J. M. Harlan, L. H. Sparks, J. R. Gamble, J. M. Agosti et A. M. Waltersdorph. 1986. "Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor". Journal of Immunology, vol. 136, p. 4220-5.

KLEIN, J. B., M. J. Rane, J. A. Scherzer, P. Y. Coxon, R. Kettritz, J. M. Mathiesen, A. Buridi et K. R. McLeish. 2000. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways". Journal of Immunology, vol. 164, p. 4286-91.

KLEMPNER, M. S., R. Noring, J. W. Mier et M. B. Atkins. 1990. "An acquired chemotactic defect in neutrophils from patients receiving interleukin-2 immunotherapy". New England Journal of Medicine, vol. 322, p. 959-65.

KLIMIUK, P. A., S. Sierakowski, R. Latosiewicz, B. Cylwik, J. Skowronski et J. Chwiecko. 2001. "Serum cytokines in different histological variants of rheumatoid arthritis". Journal of Rheumatology, vol. 28, p. 1211-7.

KLIMIUK, P. A., H. Yang, J. J. Goronzy et C. M. Weyand. 1999. "Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent". Clinical Immunology, vol. 90, p. 65-78.

KOBAYASHI, H., J. A. Carrasquillo, C. H. Paik, T. A. Waldmann et Y. Tagaya. 2000. "Differences of biodistribution, pharmacokinetics, and tumor targeting between interleukins 2 and 15". Cancer Research, vol. 60, p. 3577-83.

KOBAYASHI, H., S. Dubois, N. Sato, H. Sabzevari, Y. Sakai, T. A. Waldmann et Y. Tagaya. 2005. "Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance". Blood, vol. 105, p. 721-7.

KOBAYASHI, S. D., J. M. Voyich, K. R. Braughton et F. R. DeLeo. 2003. "Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes". Journal of Immunology, vol. 170, p. 3357-68.

- KOCH, A. E., S. L. Kunkel, M. R. Shah, S. Hosaka, M. M. Halloran, G. K. Haines, M. D. Burdick, R. M. Pope et R. M. Strieter. 1995. "Growth-related gene product alpha. A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis". Journal of Immunology, vol. 155, p. 3660-6.
- KOKA, R., P. Burkett, M. Chien, S. Chai, D. L. Boone et A. Ma. 2004. "Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells". Journal of Immunology, vol. 173, p. 3594-8.
- KOKA, R., P. R. Burkett, M. Chien, S. Chai, F. Chan, J. P. Lodolce, D. L. Boone et A. Ma. 2003. "Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice". Journal of Experimental Medicine, vol. 197, p. 977-84.
- KOMAI-KOMA, M., A. McKay, L. Thomson, C. McSharry, G. W. Chalmers, F. Y. Liew et N. C. Thomson. 2001. "Immuno-regulatory cytokines in asthma: IL-15 and IL-13 in induced sputum". Clinical and Experimental Allergy, vol. 31, p. 1441-8.
- KOTHAKOTA, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Koths, D. J. Kwiatkowski et L. T. Williams. 1997. "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis". Science, vol. 278, p. 294-8.
- KOVACS, E. 2000. "Serum levels of IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients treated with *Viscum album* extract". Biomedicine and Pharmacotherapy, vol. 54, p. 305-10.
- KOVACS, E., T. Hajto et K. Hostanska. 1991. "Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscador)". European Journal of Cancer, vol. 27, p. 1672-6.
- KOVANEN, P. E. et W. J. Leonard. 2004. "Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways". Immunological Reviews, vol. 202, p. 67-83.
- KOWANKO, I. C., E. J. Bates et A. Ferrante. 1990. "Neutrophil-mediated cartilage injury in vitro is enhanced by tumour necrosis factor alpha". Rheumatology International, vol. 10, p. 85-90.
- KOWANKO, I. C. et A. Ferrante. 1987. "Interleukin 2 inhibits migration and stimulates respiratory burst and degranulation of human neutrophils in vitro". Immunology Letters, vol. 15, p. 285-9.
- KOWANKO, I. C., T. P. Gordon, M. A. Rozenblds, P. M. Brooks et P. J. Roberts-Thomson. 1986. "The subcutaneous air pouch model of synovium and the inflammatory response to heat aggregated gammaglobulin". Agents and Actions, vol. 18, p. 421-8.

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.

KROEMER, G. 1997. "The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis". Nature Medicine, vol. 3, p. 614-20.

KRUTZIK, S. R., B. Tan, H. Li, M. T. Ochoa, P. T. Liu, S. E. Sharfstein, T. G. Graeber, P. A. Sieling, Y. J. Liu, T. H. Rea, B. R. Bloom et R. L. Modlin. 2005. "TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells". Nature Medicine, vol. 11, p. 653-660.

KUKITA, T., N. Arima, K. Matsushita, K. Arimura, H. Ohtsubo, Y. Sakaki, H. Fujiwara, A. Ozaki, T. Matsumoto et C. Tei. 2002. "Autocrine and/or paracrine growth of adult T-cell leukaemia tumour cells by interleukin 15". British Journal of Haematology, vol. 119, p. 467-74.

KUMAKI, S., R. Armitage, M. Ahdieh, L. Park et D. Cosman. 1996. "Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor alpha chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells". European Journal of Immunology, vol. 26, p. 1235-9.

KUNYASU, H., H. Ohmori, T. Sasaki, T. Sasahira, K. Yoshida, Y. Kitadai et I. J. Fidler. 2003. "Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis". Clinical Cancer Research, vol. 9, p. 4802-10.

KUNYASU, H., N. Oue, D. Nakae, M. Tsutsumi, A. Denda, T. Tsujiuchi, H. Yokozaki et W. Yasui. 2001. "Interleukin-15 expression is associated with malignant potential in colon cancer cells". Pathobiology, vol. 69, p. 86-95.

KUO, H. P., H. C. Lin, K. H. Hwang, C. H. Wang et L. C. Lu. 2000. "Lipopolysaccharide enhances substance P-mediated neutrophil adherence to epithelial cells and cytokine release". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 162, p. 1891-7.

KUROWSKA, M., W. Rudnicka, E. Kontny, I. Janicka, M. Chorazy, J. Kowalczewski, M. Ziolkowska, S. Ferrari-Lacraz, T. B. Strom et W. Maslinski. 2002a. "Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2". Journal of Immunology, vol. 169, p. 1760-7.

KUROWSKA, M., W. Rudnicka, D. Maslinska et W. Maslinski. 2002b. "Expression of IL-15 and IL-15 receptor isoforms in select structures of human fetal brain". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 966, p. 441-5.

- KURYS, 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.
- LACAL, P., R. Pulido, F. Sanchez-Madrid, C. Cabanas et F. Mollinedo. 1988. "Intracellular localization of a leukocyte adhesion glycoprotein family in the tertiary granules of human neutrophils". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 154, p. 641-7.
- LAI, Y. G., V. Gelfanov, V. Gelfanova, L. Kulik, C. L. Chu, S. W. Jeng et N. S. Liao. 1999. "IL-15 promotes survival but not effector function differentiation of CD8+ TCR α beta+ intestinal intraepithelial lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 163, p. 5843-50.
- LARBI, A., N. Douziech, C. Fortin, A. Linteau, G. Dupuis et T. Fulop Jr. 2005. "The role of the MAPK pathway alterations in GM-CSF modulated human neutrophil apoptosis with aging". Immun Ageing, vol. 2, p. 6.
- LARBRE, J. P., A. R. Moore, J. A. Da Silva, H. Iwamura, Y. Ioannou et D. A. Willoughby. 1994. "Direct degradation of articular cartilage by rheumatoid synovial fluid: contribution of proteolytic enzymes". Journal of Rheumatology, vol. 21, p. 1796-801.
- LASEK, W., G. Basak, T. Switaj, A. B. Jakubowska, P. J. Wysocki, A. Mackiewicz, N. Drela, A. Jalili, R. Kaminski, K. Kozar et M. Jakobisiak. 2004. "Complete tumour regressions induced by vaccination with IL-12 gene-transduced tumour cells in combination with IL-15 in a melanoma model in mice". Cancer Immunology, Immunotherapy, vol. 53, p. 363-72.
- LAVASTRE, V., H. Cavalli, C. Ratthe et D. Girard. 2004. "Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo". Clinical and Experimental Immunology, vol. 137, p. 272-8.
- LAVASTRE, V., M. Pelletier, R. Saller, K. Hostanska et D. Girard. 2002. "Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases". Journal of Immunology, vol. 168, p. 1419-27.
- 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.
- LEE, W. L., R. E. Harrison et S. Grinstein. 2003. "Phagocytosis by neutrophils". Microbes Infect, vol. 5, p. 1299-306.
- 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.

LEFF, J. A. et J. E. Repine. 1993. « Neutrophil-mediated tissue injury ». Chap. In J. S. Abramson et J. G. Wheeler (eds) The neutrophil, p. 229-262. New York : Oxford University Press.

LEHOURS, P., S. Raher, S. Dubois, J. Guo, A. Godard et Y. Jacques. 2000. "Subunit structure of the high and low affinity human interleukin-15 receptors". European Cytokine Network, vol. 11, p. 207-15.

LENNARTZ, M. R. 1999. "Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis". International Journal of Biochemistry and Cell Biology, vol. 31, p. 415-30.

LEONARD, W. J. et J. X. Lin. 2000. "Cytokine receptor signaling pathways". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 105, p. 877-88.

LEUENROTH, S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala et H. H. Simms. 2000. "The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 158-66.

LI, J., S. Gyorffy, S. Lee et C. S. Kwok. 1996. "Effect of recombinant human interleukin 2 on neutrophil adherence to endothelial cells in vitro". Inflammation, vol. 20, p. 361-72.

LI, X. C., G. Demirci, S. Ferrari-Lacraz, C. Groves, A. Coyle, T. R. Malek et T. B. Strom. 2001. "IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo". Nature Medicine, vol. 7, p. 114-8.

LILES, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo et S. J. Klebanoff. 1996. "Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils". Journal of Experimental Medicine, vol. 184, p. 429-40.

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 W. J. Leonard. 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.

LIU, G., Q. Zhai, D. Schaffner, C. Bradburne, A. Wu, A. Hayford, S. Popov, E. Grene, C. Bailey et K. Alibek. 2004. "IL-15 induces IFN-beta and iNOS gene expression, and antiviral activity of murine macrophage RAW 264.7 cells". Immunology Letters, vol. 91, p. 171-8.

LIU, H., Y. Ma, S. M. Cole, C. Zander, K. H. Chen, J. Karras et R. M. Pope. 2003. "Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival". Blood, vol. 102, p. 344-52.

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.

- LIU, K., M. Catalfamo, Y. Li, P. A. Henkart et N. P. Weng. 2002. "IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, p. 6192-7.
- 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.
- LO, S. K., P. A. Detmers, S. M. Levin et S. D. Wright. 1989. "Transient adhesion of neutrophils to endothelium". Journal of Experimental Medicine, vol. 169, p. 1779-93.
- 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.
- LODOLCE, J. P., P. R. Burkett, D. L. Boone, M. Chien et A. Ma. 2001. "T cell-independent interleukin 15 α signals are required for bystander proliferation". Journal of Experimental Medicine, vol. 194, p. 1187-94.
- LOPEZ, A. F., D. J. Williamson, J. R. Gamble, C. G. Begley, J. M. Harlan, S. J. Klebanoff, A. Waltersdorff, G. Wong, S. C. Clark et M. A. Vadas. 1986. "Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival". Journal of Clinical Investigation, vol. 78, p. 1220-8.
- LOPEZ, S., L. Halbwachs-Mecarelli, P. Ravaut, G. Bessou, M. Dougados et F. Porteu. 1995. "Neutrophil expression of tumour necrosis factor receptors (TNF-R) and of activation markers (CD11b, CD43, CD63) in rheumatoid arthritis". Clinical and Experimental Immunology, vol. 101, p. 25-32.
- LORD, P. C., L. M. Wilmoth, S. B. Mizel et C. E. McCall. 1991. "Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes". Journal of Clinical Investigation, vol. 87, p. 1312-21.
- LOTZ, M., R. Terkeltaub et P. M. Villiger. 1992. "Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes". Journal of Immunology, vol. 148, p. 466-73.
- LU, J., R. L. Giuntoli 2nd, R. Omiya, H. Kobayashi, R. Kennedy et E. Celis. 2002. "Interleukin 15 promotes antigen-independent in vitro expansion and long-term survival of antitumor cytotoxic T lymphocytes". Clinical Cancer Research, vol. 8, p. 3877-84.
- LUKIC, M. L., E. Mensah-Brown, X. Wei, A. Shahin et F. Y. Liew. 2003. "Lack of the mediators of innate immunity attenuate the development of autoimmune diabetes in mice". Journal of Autoimmunity, vol. 21, p. 239-46.

LUM, J. J., G. Bren, R. McClure et A. D. Badley. 2005. "Elimination of Senescent Neutrophils by TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand". Journal of Immunology, vol. 175, p. 1232-8.

MA, H. L., M. J. Whitters, R. F. Konz, M. Senices, D. A. Young, M. J. Grusby, M. Collins et K. Dunussi-Joannopoulos. 2003. "IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma". Journal of Immunology, vol. 171, p. 608-15.

MAIANSKI, N. A., J. Geissler, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, D. Roos et T. W. Kuijpers. 2004. "Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis". Cell Death and Differentiation, vol. 11, p. 143-53.

MAIANSKI, N. A., D. Roos et T. W. Kuijpers. 2003. "Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils". Blood, vol. 101, p. 1987-95.

MALE, D. K. 1999. Immunologie. Aide-mémoire illustré. 2^e édition. Bruxelles : De Boeck Université. 130 p.

MALYAK, M., M. F. Smith Jr, A. A. Abel et W. P. Arend. 1994. "Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta". Journal of Clinical Immunology, vol. 14, p. 20-30.

MARIE, C., C. Pitton, C. Fitting et J. M. Cavaillon. 1996. "IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils". Cytokine, vol. 8, p. 147-51.

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.

MARKS-KONCZALIK, J., S. Dubois, J. M. Losi, H. Sabzevari, N. Yamada, L. Feigenbaum, T. A. Waldmann et Y. Tagaya. 2000. "IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, p. 11445-50.

MARLEAU, A. M. et N. Sarvetnick. 2005. "T cell homeostasis in tolerance and immunity". Journal of Leukocyte Biology, vol. 78, p. 575-84.

MARTIN, S. J., J. G. Bradley et T. G. Cotter. 1990. "HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis". Clinical and Experimental Immunology, vol. 79, p. 448-53.

MARTIN, S. J., C. P. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. van Schie, D. M. LaFace et D. R. Green. 1995. "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl". Journal of Experimental Medicine, vol. 182, p. 1545-56.

MASTROIANNI, C. M., G. d'Ettorre, G. Forcina, M. Lichtner, F. Mengoni, C. D'Agostino, A. Corpolongo, A. P. Massetti et V. Vullo. 2000. "Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection". Blood, vol. 96, p. 1979-84.

MASUDA, A., T. Matsuguchi, K. Yamaki, T. Hayakawa, M. Kubo, W. J. LaRoche 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.

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.

MATSUDA, J. L., L. Gapin, S. Sidobre, W. C. Kieper, J. T. Tan, R. Ceredig, C. D. Surh et M. Kronenberg. 2002. "Homeostasis of V alpha 14i NKT cells". Nat Immunol, vol. 3, p. 966-74.

MATSUKAWA, A., T. Yoshimura, T. Maeda, S. Ohkawara, K. Takagi et M. Yoshinaga. 1995. "Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 in rabbits. IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in vivo". Journal of Immunology, vol. 154, p. 5418-25.

MATSUMOTO, Y., I. Saiki, J. Murata, H. Okuyama, M. Tamura et I. Azuma. 1991. "Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor inhibits the metastasis of hematogenous and non-hematogenous tumors in mice". International Journal of Cancer, vol. 49, p. 444-9.

MATZER, S. P., T. Baumann, N. W. Lukacs, M. Rollinghoff et H. U. Beuscher. 2001. "Constitutive expression of macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2) mRNA in bone marrow gives rise to peripheral neutrophils with preformed MIP-2 protein". Journal of Immunology, vol. 167, p. 4635-43.

MATZNER, Y. 1997. "Neutrophil pathophysiology". Seminars in Hematology, vol. 34, p. 265-6.

MATZNER, Y., R. Gavison, E. A. Rachmilewitz et E. Fibach. 1987. "Expression of granulocytic functions by leukemic promyelocytic HL-60 cells: differential induction by dimethylsulfoxide and retinoic acid". Cell Differentiation, vol. 21, p. 261-9.

MCCOLL, S. R., R. Paquin, C. Menard et A. D. Beaulieu. 1992. "Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha". Journal of Experimental Medicine, vol. 176, p. 593-8.

MCDONALD, P. P., C. Bovolenta et M. A. Cassatella. 1998a. "Activation of distinct transcription factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon-gamma, and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases". Biochemistry, vol. 37, p. 13165-73.

MCDONALD, P. P., M. P. Russo, S. Ferrini et M. A. Cassatella. 1998b. "Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils". Blood, vol. 92, p. 4828-35.

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.

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.

MCLOUGHLIN, R. M., J. Witowski, R. L. Robson, T. S. Wilkinson, S. M. Hurst, A. S. Williams, J. D. Williams, S. Rose-John, S. A. Jones et N. Topley. 2003. "Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation". Journal of Clinical Investigation, vol. 112, p. 598-607.

MEAGHER, L. C., J. S. Savill, A. Baker, R. W. Fuller et C. Haslett. 1992. "Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2". Journal of Leukocyte Biology, vol. 52, p. 269-73.

MEAZZA, R., S. Basso, A. Gaggero, D. Detotero, L. Trentin, R. Pereno, B. Azzarone et S. Ferrini. 1998. "Interleukin (IL)-15 induces survival and proliferation of the growth factor-dependent acute myeloid leukemia M-07e through the IL-2 receptor beta/gamma". International Journal of Cancer, vol. 78, p. 189-95.

MEAZZA, R., P. L. Lollini, P. Nanni, C. De Giovanni, A. Gaggero, A. Comes, M. Cilli, E. Di Carlo, S. Ferrini et P. Musiani. 2000. "Gene transfer of a secretable form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response". International Journal of Cancer, vol. 87, p. 574-81.

MEHTA, D. S., A. L. Wurster et M. J. Grusby. 2004. "Biology of IL-21 and the IL-21 receptor". Immunological Reviews, vol. 202, p. 84-95.

MEHTA, D. S., A. L. Wurster, A. S. Weinmann et M. J. Grusby. 2005. "NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, p. 2016-21.

- MEHTA, D. S., A. L. Wurster, M. J. Whitters, D. A. Young, M. Collins et M. J. Grusby. 2003. "IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells". Journal of Immunology, vol. 170, p. 4111-8.
- MENGS, U., D. Gotherl et E. Leng-Peschlow. 2002. "Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research". Anticancer Research, vol. 22, p. 1399-407.
- MESZAROS, A. J., J. S. Reichner et J. E. Albina. 1999. "Macrophage phagocytosis of wound neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 65, p. 35-42.
- METCALF, D. 1993. "Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?". Blood, vol. 82, p. 3515-23.
- METZNER, G., H. Franz, A. Kindt, B. Fahlbusch et J. Suss. 1985. "The in vitro activity of lectin I from mistletoe (ML I) and its isolated A and B chains on functions of macrophages and polymorphonuclear cells". Immunobiology, vol. 169, p. 461-71.
- MIDORIKAWA, Y., T. Yamashita et F. Sendo. 1990. "Modulation of the immune response to transplanted tumors in rats by selective depletion of neutrophils in vivo using a monoclonal antibody: abrogation of specific transplantation resistance to chemical carcinogen-induced syngeneic tumors by selective depletion of neutrophils in vivo". Cancer Research, vol. 50, p. 6243-7.
- MIIKE, S., A. Nakao, M. Hiraguri, K. Kurasawa, Y. Saito et I. Iwamoto. 1999. "Involvement of JAK2, but not PI 3-kinase/Akt and MAP kinase pathways, in anti-apoptotic signals of GM-CSF in human eosinophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 65, p. 700-6.
- MIN, S. Y., S. Y. Hwang, Y. O. Jung, J. Jeong, S. H. Park, C. S. Cho, H. Y. Kim et W. U. Kim. 2004. "Increase of cyclooxygenase-2 expression by interleukin 15 in rheumatoid synoviocytes". Journal of Rheumatology, vol. 31, p. 875-83.
- MINAGAWA, M., H. Watanabe, C. Miyaji, K. Tomiyama, H. Shimura, A. Ito, M. Ito, J. Domen, I. L. Weissman et K. Kawai. 2002. "Enforced expression of Bcl-2 restores the number of NK cells, but does not rescue the impaired development of NKT cells or intraepithelial lymphocytes, in IL-2/IL-15 receptor beta-chain-deficient mice". Journal of Immunology, vol. 169, p. 4153-60.
- MIRANDA-CARUS, M. E., A. Balsa, M. Benito-Miguel, C. Perez de Ayala et E. Martin-Mola. 2004. "IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate". Journal of Immunology, vol. 173, p. 1463-76.
- MIRANDA, M. B., T. F. McGuire et D. E. Johnson. 2002. "Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines". Leukemia, vol. 16, p. 683-92.

MIYAMOTO, M., O. Prause, M. Sjostrand, M. Laan, J. Lotvall et A. Linden. 2003. "Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways". Journal of Immunology, vol. 170, p. 4665-72.

MODY, C. H., J. C. Spurrell et C. J. Wood. 1998. "Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes". Journal of Infectious Diseases, vol. 178, p. 803-14.

MOHAMADZADEH, M., F. Berard, G. Essert, C. Chalouni, B. Pulendran, J. Davoust, G. Bridges, A. K. Palucka et J. Banchereau. 2001. "Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 194, p. 1013-20.

MOHR, W., B. Pelster et D. Wessinghage. 1984. "Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. VI. The occurrence of PMNs in menisci of patients with rheumatoid arthritis". Rheumatology International, vol. 5, p. 39-44.

MONTELEONE, G., I. Monteleone, D. Fina, P. Vavassori, G. Del Vecchio Blanco, R. Caruso, R. Tersigni, L. Alessandrini, L. Biancone, G. C. Naccari, T. T. MacDonald et F. Pallone. 2005. "Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease". Gastroenterology, vol. 128, p. 687-94.

MORDELET-DAMBRINE, M., C. Lafuma, G. Stanislas-Leguern, L. Robert, J. Chretien et W. Hornebeck. 1988. "Elastase activity of bronchoalveolar cells in advanced pulmonary sarcoidosis". European Respiratory Journal, vol. 1, p. 748-57.

MOROZ, A., C. Eppolito, Q. Li, J. Tao, C. H. Clegg et P. A. Shrikant. 2004. "IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21". Journal of Immunology, vol. 173, p. 900-9.

MORTIER, E., J. Bernard, A. Plet et Y. Jacques. 2004. "Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist". Journal of Immunology, vol. 173, p. 1681-8.

MOULDING, D. A., C. Akgul, M. Derouet, M. R. White et S. W. Edwards. 2001. "BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 70, p. 783-92.

MOULDING, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart et S. W. Edwards. 1998. "Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival". Blood, vol. 92, p. 2495-502.

MOXEY-MIMS, M. M., H. H. Simms, M. M. Frank, E. Y. Lin et 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". Journal of Immunology, vol. 147, p. 1823-30.

- 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.
- MUELLER, Y. M., P. M. Bojczuk, E. S. Halstead, A. H. Kim, J. Witek, J. D. Altman et P. D. Katsikis. 2003. "IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells". Blood, vol. 101, p. 1024-9.
- MUENCH, M. O., L. Humeau, B. Paek, T. Ohkubo, L. L. Lanier, C. T. Albanese et A. Barcena. 2000. "Differential effects of interleukin-3, interleukin-7, interleukin 15, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors". Experimental Hematology, vol. 28, p. 961-73.
- MULLER-QUERNHEIM, J. 1998. "Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application". European Respiratory Journal, vol. 12, p. 716-38.
- MURAO, S., M. A. Gemmell, M. F. Callaham, N. L. Anderson et E. Huberman. 1983. "Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and phorbol-12-myristate-13-acetate". Cancer Research, vol. 43, p. 4989-96.
- MURO, S., R. Taha, A. Tsicopoulos, R. Olivenstein, A. B. Tonnel, P. Christodoulopoulos, B. Wallaert et Q. Hamid. 2001. "Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary diseases". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 108, p. 970-5.
- MURRAY, A. M., B. Simm et K. W. Beagley. 1998. "Cytokine gene expression in murine fetal intestine: potential for extrathymic T cell development". Cytokine, vol. 10, p. 337-45.
- MURRAY, J., J. A. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. Van Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett et E. R. Chilvers. 1997. "Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro". Blood, vol. 90, p. 2772-83.
- MUSIANI, P., A. Allione, A. Modica, P. L. Lollini, M. Giovarelli, F. Cavallo, F. Belardelli, G. Forni et A. Modesti. 1996. "Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha". Laboratory Investigation, vol. 74, p. 146-57.
- MUSIANI, P., A. Modesti, M. Giovarelli, F. Cavallo, M. P. Colombo, P. L. Lollini et G. Forni. 1997. "Cytokines, tumour-cell death and immunogenicity: a question of choice". Immunology Today, vol. 18, p. 32-6.

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.

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.

NAGANO, S., T. Otsuka, H. Niuro, K. Yamaoka, Y. Arinobu, E. Ogami, M. Akahoshi, Y. Inoue, K. Miyake, H. Nakashima, Y. Niho et M. Harada. 2002. "Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway and regulation by anti-inflammatory cytokines". International Immunology, vol. 14, p. 733-40.

NAKAE, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano et Y. Iwakura. 2002. "Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses". Immunity, vol. 17, p. 375-87.

NAKAE, S., A. Nambu, K. Sudo et Y. Iwakura. 2003. "Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice". Journal of Immunology, vol. 171, p. 6173-7.

NAKANO, H., T. Kishida, H. Asada, M. Shin-Ya, T. Shinomiya, J. Imanishi, T. Shimada, S. Nakai, M. Takeuchi, Y. Hisa et O. Mazda. 2005. "Interleukin-21 triggers both cellular and humoral immune responses leading to therapeutic antitumor effects against head and neck squamous cell carcinoma". J Gene Med, vol.

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.

NANKI, T., K. Hayashida, H. S. El-Gabalawy, S. Suson, K. Shi, H. J. Girschick, S. Yavuz et P. E. Lipsky. 2000. "Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium". Journal of Immunology, vol. 165, p. 6590-8.

NATHAN, C. F. 1989. "Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G". Blood, vol. 73, p. 301-6.

NEELY, G. G., S. Epelman, L. L. Ma, P. Colarusso, C. J. Howlett, E. K. Amankwah, A. C. McIntyre, S. M. Robbins et C. H. Mody. 2004. "Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling". Journal of Immunology, vol. 172, p. 4225-34.

- NEELY, G. G., S. M. Robbins, E. K. Amankwah, S. Epelman, H. Wong, J. C. Spurrell, K. K. Jandu, W. Zhu, D. K. Fogg, C. B. Brown et C. H. Mody. 2001. "Lipopolysaccharide-stimulated or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated monocytes rapidly express biologically active IL-15 on their cell surface independent of new protein synthesis". Journal of Immunology, vol. 167, p. 5011-7.
- NEURATH, M. F., K. Hildner, C. Becker, J. F. Schlaak, K. Barbulescu, T. Germann, E. Schmitt, P. Schirmacher, S. Haralambous, M. Pasparakis, K. H. Meyer Zum Buschenfelde, G. Kollias et E. Marker-Hermann. 1999. "Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression". Clinical and Experimental Immunology, vol. 115, p. 42-55.
- NEWBURGER, P. E., C. Speier, N. Borregaard, C. E. Walsh, J. C. Whitin et E. R. Simons. 1984. "Development of the superoxide-generating system during differentiation of the HL-60 human promyelocytic leukemia cell line". Journal of Biological Chemistry, vol. 259, p. 3771-6.
- NIETO, M., M. A. del Pozo et F. Sanchez-Madrid. 1996. "Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes". European Journal of Immunology, vol. 26, p. 1302-7.
- NIRO, H., T. Otsuka, K. Izuhara, K. Yamaoka, K. Ohshima, T. Tanabe, S. Hara, Y. Nemoto, Y. Tanaka, H. Nakashima et Y. Niho. 1997. "Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils". Blood, vol. 89, p. 1621-8.
- NISHIMURA, H., A. Fujimoto, N. Tamura, T. Yajima, W. Wajjwalku et Y. Yoshikai. 2005. "A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing". FASEB Journal, vol. 19, p. 19-28.
- NISHIMURA, H., K. Hiromatsu, N. Kobayashi, K. H. Grabstein, R. Paxton, K. Sugamura, J. A. Bluestone et Y. Yoshikai. 1996. "IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection". Journal of Immunology, vol. 156, p. 663-9.
- NISHIMURA, H., J. Washizu, N. Nakamura, A. Enomoto et Y. Yoshikai. 1998. "Translational efficiency is up-regulated by alternative exon in murine IL-15 mRNA". Journal of Immunology, vol. 160, p. 936-42.
- NISHIMURA, H., T. Yajima, Y. Naiki, H. Tsunobuchi, M. Umemura, K. Itano, T. Matsuguchi, M. Suzuki, P. S. Ohashi et Y. Yoshikai. 2000. "Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo". Journal of Experimental Medicine, vol. 191, p. 157-70.

NISHIWAKI, T., K. Ina, H. Goto, O. Watanabe, T. Tsuzuki, R. Furuta, T. Ando, K. Hibi et K. Kusugami. 2005. "Possible involvement of the interleukin-15 and interleukin-15 receptor system in a heightened state of lamina propria B cell activation and differentiation in patients with inflammatory bowel disease". Journal of Gastroenterology, vol. 40, p. 128-36.

NOFFZ, G., Z. Qin, M. Kopf et T. Blankenstein. 1998. "Neutrophils but not eosinophils are involved in growth suppression of IL-4-secreting tumors". Journal of Immunology, vol. 160, p. 345-50.

NOGUCHI, M., S. Adelstein, X. Cao et W. J. Leonard. 1993a. "Characterization of the human interleukin-2 receptor gamma chain gene". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 13601-8.

NOGUCHI, M., H. Yi, H. M. Rosenblatt, A. H. Filipovich, S. Adelstein, W. S. Modi, O. W. McBride et W. J. Leonard. 1993b. "Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans". Cell, vol. 73, p. 147-57.

NORSWORTHY, P. J., L. Fossati-Jimack, J. Cortes-Hernandez, P. R. Taylor, A. E. Bygrave, R. D. Thompson, S. Nourshargh, M. J. Walport et M. Botto. 2004. "Murine CD93 (C1qRp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for C1q-mediated enhancement of phagocytosis". Journal of Immunology, vol. 172, p. 3406-14.

NOVO NORDISK. 2004. Novo Nordisk Annual Report 2004. Denmark.

O'NEILL, A. J., B. T. Doyle, E. Molloy, C. Watson, D. Phelan, M. C. Greenan, J. M. Fitzpatrick et R. W. Watson. 2004. "Gene expression profile of inflammatory neutrophils: alterations in the inhibitors of apoptosis proteins during spontaneous and delayed apoptosis". Shock, vol. 21, p. 512-8.

OGASAWARA, K., S. Hida, N. Azimi, Y. Tagaya, T. Sato, T. Yokochi-Fukuda, T. A. Waldmann, T. Taniguchi et S. Taki. 1998. "Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells". Nature, vol. 391, p. 700-3.

OGATA, Y., A. Kukita, T. Kukita, M. Komine, A. Miyahara, S. Miyazaki et O. Kohashi. 1999. "A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2". Journal of Immunology, vol. 162, p. 2754-60.

OH, S., L. P. Perera, D. S. Burke, T. A. Waldmann et J. A. Berzofsky. 2004. "IL-15/IL-15Ralpha-mediated avidity maturation of memory CD8+ T cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, p. 15154-9.

OHSHIMA, S., Y. Saeki, T. Mima, M. Sasai, K. Nishioka, H. Ishida, M. Shimizu, M. Suemura, R. McCloskey et T. Kishimoto. 1999. "Long-term follow-up of the changes in circulating cytokines, soluble cytokine receptors, and white blood cell subset counts in patients with rheumatoid arthritis (RA) after monoclonal anti-TNF alpha antibody therapy". Journal of Clinical Immunology, vol. 19, p. 305-13.

OHTEKI, T., S. Ho, H. Suzuki, T. W. Mak et P. S. Ohashi. 1997. "Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development". Journal of Immunology, vol. 159, p. 5931-5.

OHTEKI, T., K. Suzue, C. Maki, T. Ota et S. Koyasu. 2001. "Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response". Nat Immunol, vol. 2, p. 1138-43.

OHTEKI, T., H. Yoshida, T. Matsuyama, G. S. Duncan, T. W. Mak et P. S. Ohashi. 1998. "The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 187, p. 967-72.

OLSNES, S., F. Stirpe, K. Sandvig et A. Pihl. 1982. "Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)". Journal of Biological Chemistry, vol. 257, p. 13263-70.

ONU, A., T. Pohl, H. Krause et S. Bulfone-Paus. 1997. "Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms". Journal of Immunology, vol. 158, p. 255-62.

OPDENAKKER, G., S. Masure, B. Grillet et J. Van Damme. 1991. "Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis". Lymphokine and Cytokine Research, vol. 10, p. 317-24.

OPPENHEIMER-MARKS, N., R. I. Brezinschek, M. Mohamadzadeh, R. Vita et P. E. Lipsky. 1998. "Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model In vivo". Journal of Clinical Investigation, vol. 101, p. 1261-72.

ORLOFSKY, A., R. D. Somogyi, L. M. Weiss et M. B. Prystowsky. 1999. "The murine antiapoptotic protein A1 is induced in inflammatory macrophages and constitutively expressed in neutrophils". Journal of Immunology, vol. 163, p. 412-9.

OTTONELLO, L., M. Cutolo, G. Frumento, N. Arduino, M. Bertolotto, M. Mancini, E. Sottofattori et F. Dallegri. 2002a. "Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines". Rheumatology, vol. 41, p. 1249-60.

OTTONELLO, L., G. Frumento, N. Arduino, M. Bertolotto, P. Dapino, M. Mancini et F. Dallegri. 2002b. "Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3". Journal of Leukocyte Biology, vol. 72, p. 125-32.

OZAKI, K., K. Kikly, D. Michalovich, P. R. Young et W. J. Leonard. 2000. "Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, p. 11439-44.

OZAKI, K. et W. J. Leonard. 2002. "Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 29355-8.

OZAKI, K., R. Spolski, R. Ettinger, H. P. Kim, G. Wang, C. F. Qi, P. Hwu, D. J. Shaffer, S. Akilesh, D. C. Roopenian, H. C. Morse 3rd, P. E. Lipsky et W. J. Leonard. 2004. "Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6". Journal of Immunology, vol. 173, p. 5361-71.

OZAKI, K., R. Spolski, C. G. Feng, C. F. Qi, J. Cheng, A. Sher, H. C. Morse 3rd, C. Liu, P. L. Schwartzberg et W. J. Leonard. 2002. "A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production". Science, vol. 298, p. 1630-4.

PAN, Z. Z., L. Parkyn, A. Ray et P. Ray. 2000. "Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, vol. 279, p. L658-66.

PARK, L. S., D. J. Friend, A. E. Schmierer, S. K. Dower et A. E. Namen. 1990. "Murine interleukin 7 (IL-7) receptor. Characterization on an IL-7-dependent cell line". Journal of Experimental Medicine, vol. 171, p. 1073-89.

PARK, R., M. S. Kim, H. S. So, B. H. Jung, S. R. Moon, S. Y. Chung, C. B. Ko, B. R. Kim et H. T. Chung. 2000. "Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells". Biochemical Pharmacology, vol. 60, p. 1685-91.

PARK, S. Y., K. Saijo, T. Takahashi, M. Osawa, H. Arase, N. Hirayama, K. Miyake, H. Nakauchi, T. Shirasawa et T. Saito. 1995. "Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice". Immunity, vol. 3, p. 771-82.

PARRISH-NOVAK, J., S. R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J. A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C. Brandt, J. L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S. R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F. J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Rayond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R. D. Holly et D. Foster. 2000. "Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function". Nature, vol. 408, p. 57-63.

PARRISH-NOVAK, J., D. C. Foster, R. D. Holly et C. H. Clegg. 2002. "Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses". Journal of Leukocyte Biology, vol. 72, p. 856-63.

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.

PATEL, D. D. et B. F. Haynes. 2001. "Leukocyte homing to synovium". Curr Dir Autoimmun, vol. 3, p. 133-67.

PELLETIER, M., A. Bouchard et D. Girard. 2004. "In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation". Journal of Immunology, vol. 173, p. 7521-30.

PELLETIER, M., V. Lavastre et D. Girard. 2002a. "Activation of human epithelial lung a549 cells by the pollutant sodium sulfite: enhancement of neutrophil adhesion". Toxicological Sciences, vol. 69, p. 210-6.

PELLETIER, M., C. Rathe et D. Girard. 2002b. "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.

PENE, J., J. F. Gauchat, S. Lecart, E. Drouet, P. Guglielmi, V. Boulay, A. Delwail, D. Foster, J. C. Lecron et H. Yssel. 2004. "Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells". Journal of Immunology, vol. 172, p. 5154-7.

PERENO, R., A. Gaggero, M. Scudeletti, L. Lanza, R. Meazza, Z. Mishal, C. Jasmin, F. Indiveri, S. Ferrini et B. Azzarone. 1999. "IL-15/IL-15R alpha intracellular trafficking in human cells and protection from apoptosis". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 876, p. 236-45.

PERENO, R., J. Giron-Michel, A. Gaggero, E. Cazes, R. Meazza, M. Monetti, E. Monaco, Z. Mishal, C. Jasmin, F. Indiveri, S. Ferrini et B. Azzarone. 2000. "IL-15/IL-15Ralpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha". Oncogene, vol. 19, p. 5153-62.

PERERA, L. P., C. K. Goldman et T. A. Waldmann. 1999. "IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 162, p. 2606-12.

PERICLE, F., R. A. Kirken, P. K. Epling-Burnette, D. K. Blanchard et J. Y. Djeu. 1996. "Direct killing of interleukin-2-transfected tumor cells by human neutrophils". International Journal of Cancer, vol. 66, p. 367-73.

PERICLE, F., J. H. Liu, J. I. Diaz, D. K. Blanchard, S. Wei, G. Forni et J. Y. Djeu. 1994. "Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils". European Journal of Immunology, vol. 24, p. 440-4.

PETRIN, D., S. Turcotte, A. K. Gilbert, M. Rola-Pleszczynski et J. Stankova. 2005. "The anti-apoptotic effect of leukotriene B(4) in neutrophils: A role for phosphatidylinositol 3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and Mcl-1". Cellular Signalling, vol.

PICHYANGKUL, S., P. Saengkrai, K. Yongvanitchit, D. G. Heppner, D. E. Kyle et H. K. Webster. 1997. "Regulation of leukocyte adhesion molecules CD11b/CD18 and leukocyte adhesion molecule-1 on phagocytic cells activated by malaria pigment". American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 57, p. 383-8.

PILLINGER, M. H. et S. B. Abramson. 1995. "The neutrophil in rheumatoid arthritis". Rheumatic Diseases Clinics of North America, vol. 21, p. 691-714.

PIRTSKHALAISHVILI, G., G. V. Shurin, C. Esche, Q. Cai, R. R. Salup, S. N. Bykovskaia, M. T. Lotze et M. R. Shurin. 2000. "Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins". British Journal of Cancer, vol. 83, p. 506-13.

POLLEY, M. J., M. L. Phillips, E. Wayner, E. Nudelman, A. K. Singhal, S. Hakomori et J. C. Paulson. 1991. "CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 6224-8.

PONGRACZ, J., P. Webb, K. Wang, E. Deacon, O. J. Lunn et J. M. Lord. 1999. "Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 37329-34.

PONTI, C., M. Falconi, A. M. Billi, I. Faenza, S. Castorina, L. Caimi, A. Cacchioli, L. Cocco et M. Vitale. 2002. "IL-12 and IL-15 induce activation of nuclear PLCbeta in human natural killer cells". International Journal of Oncology, vol. 20, p. 149-53.

PORTER, B. O. et T. R. Malek. 2000. "Thymic and intestinal intraepithelial T lymphocyte development are each regulated by the gammac-dependent cytokines IL-2, IL-7, and IL-15". Seminars in Immunology, vol. 12, p. 465-74.

POTAPNEV, M. P., D. V. Marinich, D. V. Pechkovskii, L. G. Bortkevich et A. M. Maslovskaja. 1994. "Changes in the functional activity of human neutrophils under the action of recombinant interleukin-2". Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii, vol. 80-4.

PRINZ, M., U. K. Hanisch, H. Kettenmann et F. Kirchhoff. 1998. "Alternative splicing of mouse IL-15 is due to the use of an internal splice site in exon 5". Brain Research. Molecular Brain Research, vol. 63, p. 155-62.

- PRIOR, C., R. A. Knight, M. Herold, G. Ott et M. A. Spiteri. 1996. "Pulmonary sarcoidosis: patterns of cytokine release in vitro". European Respiratory Journal, vol. 9, p. 47-53.
- PRILIC, M., B. R. Blazar, M. A. Farrar et S. C. Jameson. 2003. "In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 197, p. 967-76.
- PUZANOV, I. J., M. Bennett et V. Kumar. 1996. "IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells". Journal of Immunology, vol. 157, p. 4282-5.
- QIN, J. Z., R. Dummer, G. Burg et U. Dobbeling. 1999. "Constitutive and interleukin-7/interleukin-15 stimulated DNA binding of Myc, Jun, and novel Myc-like proteins in cutaneous T-cell lymphoma cells". Blood, vol. 93, p. 260-7.
- QIN, J. Z., C. L. Zhang, J. Kamarashev, R. Dummer, G. Burg et U. Dobbeling. 2001. "Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells". Blood, vol. 98, p. 2778-83.
- QUINN, L. S., K. L. Haugk et S. E. Damon. 1997. "Interleukin-15 stimulates C2 skeletal myoblast differentiation". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 239, p. 6-10.
- QUINN, L. S., K. L. Haugk et K. H. Grabstein. 1995. "Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle". Endocrinology, vol. 136, p. 3669-72.
- QUINN, L. S., L. Strait-Bodey, B. G. Anderson, J. M. Argiles et P. J. Havel. 2005. "Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: Evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway". Cell Biology International, vol.
- RANSON, T., C. A. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, V. Laloux, A. Lehuen et J. P. Di Santo. 2003a. "IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, p. 2663-8.
- RANSON, T., C. A. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, W. Muller et J. P. Di Santo. 2003b. "IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis". Blood, vol. 101, p. 4887-93.
- RAPPL, G., A. Kapsokefalou, C. Heuser, M. Rössler, S. Ugurel, W. Tilgen, U. Reinhold et H. Abken. 2001. "Dermal fibroblasts sustain proliferation of activated T cells via membrane-bound interleukin-15 upon long-term stimulation with tumor necrosis factor- α ". Journal of Investigative Dermatology, vol. 116, p. 102-9.

RATTHE, C. et D. Girard. 2004. "Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15 α chain". Journal of Leukocyte Biology, vol. 76, p. 162-8.

RAZA, K., F. Falciani, S. J. Curnow, E. J. Ross, C. Y. Lee, A. N. Akbar, J. M. Lord, C. Gordon, C. D. Buckley et M. Salmon. 2005. "Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin". Arthritis Res Ther, vol. 7, p. R784-95.

RE, F., M. Mengozzi, M. Muzio, C. A. Dinarello, A. Mantovani et F. Colotta. 1993. "Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells". European Journal of Immunology, vol. 23, p. 570-3.

RECKLIES, A. D. et E. E. Golds. 1992. "Induction of synthesis and release of interleukin-8 from human articular chondrocytes and cartilage explants". Arthritis and Rheumatism, vol. 35, p. 1510-9.

REED, J. C. 1994. "Bcl-2 and the regulation of programmed cell death". Journal of Cell Biology, vol. 124, p. 1-6.

REGLIER-POUPET, H., J. Hakim, M. A. Gougerot-Pocidallo et C. Elbim. 1998. "Absence of regulation of human polymorphonuclear oxidative burst by interleukin-10, interleukin-4, interleukin-13 and transforming growth factor-beta in whole blood". European Cytokine Network, vol. 9, p. 633-8.

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.

RENSHAW, S. A., J. S. Parmar, V. Singleton, S. J. Rowe, D. H. Dockrell, S. K. Dower, C. D. Bingle, E. R. Chilvers et M. K. Whyte. 2003. "Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL". Journal of Immunology, vol. 170, p. 1027-33.

RIBEIRO, R. A., F. Q. Cunha et S. H. Ferreira. 1990. "Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor". International Journal of Experimental Pathology, vol. 71, p. 717-25.

RIBEIRO, R. A., C. A. Flores, F. Q. Cunha et S. H. Ferreira. 1991. "IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism". Immunology, vol. 73, p. 472-7.

RIJNEVELD, A. W., G. P. van den Dobbelsteen, S. Florquin, T. J. Standiford, P. Speelman, L. van Alphen et T. van der Poll. 2002. "Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice". Journal of Infectious Diseases, vol. 185, p. 123-6.

ROLLET-LABELLE, E., M. J. Grange, C. Elbim, C. Marquetty, M. A. Gougerot-Pocidalo et C. Pasquier. 1998. "Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis". Free Radical Biology and Medicine, vol. 24, p. 563-72.

ROSMARIN, A. G., S. C. Weil, G. L. Rosner, J. D. Griffin, M. A. Arnaout et D. G. Tenen. 1989. "Differential expression of CD11b/CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation". Blood, vol. 73, p. 131-6.

ROSOLEN, A., M. Nakanishi, D. G. Poplack, D. Cole, R. Quinones, G. Reaman, J. B. Trepel, J. D. Cotelingam, E. A. Sausville, G. E. Marti, E. S. Jaffe, L. M. Neckers et O. R. Colamonici. 1989. "Expression of interleukin-2 receptor beta subunit in hematopoietic malignancies". Blood, vol. 73, p. 1968-72.

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.

ROZERA, C., D. Carlei, P. L. Lollini, C. De Giovanni, P. Musiani, E. Di Carlo, F. Belardelli et M. Ferrantini. 1999. "Interferon (IFN)-beta gene transfer into TS/A adenocarcinoma cells and comparison with IFN-alpha: differential effects on tumorigenicity and host response". American Journal of Pathology, vol. 154, p. 1211-22.

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.

RUCKERT, R., K. Asadullah, M. Seifert, V. M. Budagian, R. Arnold, C. Trombotto, R. Paus et S. Bulfone-Paus. 2000. "Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis?". Journal of Immunology, vol. 165, p. 2240-50.

SAIKH, K. U., A. S. Khan, T. Kissner et R. G. Ulrich. 2001. "IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells". Clinical and Experimental Immunology, vol. 126, p. 447-55.

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.

SAKAMOTO, C., K. Suzuki, F. Hato, M. Akahori, T. Hasegawa, M. Hino et S. Kitagawa. 2003. "Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway". International Journal of Hematology, vol. 77, p. 60-70.

SALANOVA, B., M. Choi, S. Rolle, M. Wellner, C. Scheidereit et F. C. Luft. 2005. "The effect of fever-like temperatures on neutrophil signaling". FASEB Journal, vol. 19, p. 816-8.

SALEEM, S., Z. Dai, S. N. Coelho, B. T. Konieczny, K. J. Assmann, F. K. Baddoura et F. G. Lakkis. 1998. "IL-4 is an endogenous inhibitor of neutrophil influx and subsequent pathology in acute antibody-mediated inflammation". Journal of Immunology, vol. 160, p. 979-84.

SALLUSTO, F. et A. Lanzavecchia. 2000. "Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression". Immunological Reviews, vol. 177, p. 134-40.

SANCHO, D., M. Yanez-Mo, R. Tejedor et F. Sanchez-Madrid. 1999. "Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15". Blood, vol. 93, p. 886-96.

SANDAU, M. M., K. S. Schluns, L. Lefrancois et S. C. Jameson. 2004. "Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells". Journal of Immunology, vol. 173, p. 6537-41.

SANTOS-BENEIT, A. M. et F. Mollinedo. 2000. "Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells". Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 712-24.

SATOH, J., K. Kurohara, M. Yukitake et Y. Kuroda. 1998. "Interleukin-15, a T-cell growth factor, is expressed in human neural cell lines and tissues". Journal of the Neurological Sciences, vol. 155, p. 170-7.

SAVILL, J., I. Dransfield, N. Hogg et C. Haslett. 1990. "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis". Nature, vol. 343, p. 170-3.

SAVILL, J., N. Hogg, Y. Ren et C. Haslett. 1992. "Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis". Journal of Clinical Investigation, vol. 90, p. 1513-22.

SAVILL, J. S., P. M. Henson et C. Haslett. 1989a. "Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism". Journal of Clinical Investigation, vol. 84, p. 1518-27.

SAVILL, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson et C. Haslett. 1989b. "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.

SAVOIE, A., V. Lavastre, M. Pelletier, T. Hajto, K. Hostanska et D. Girard. 2000. "Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 845-53.

SCHLUNS, K. S., K. D. Klonowski et L. Lefrancois. 2004. "Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15 α bone marrow-derived cells". Blood, vol. 103, p. 988-94.

SCHLUNS, K. S., T. Stoklasek et L. Lefrancois. 2005. "The roles of interleukin-15 receptor α : trans-presentation, receptor component, or both?". International Journal of Biochemistry and Cell Biology, vol. 37, p. 1567-71.

SCHLUNS, K. S., K. Williams, A. Ma, X. X. Zheng et L. Lefrancois. 2002. "Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells". Journal of Immunology, vol. 168, p. 4827-31.

SCHUMANN, R. R., T. Nakarai, H. J. Gruss, M. A. Brach, U. von Arnim, C. Kirschning, L. Karawajew, W. D. Ludwig, J. C. Renauld, J. Ritz et F. Herrmann. 1996. "Transcript synthesis and surface expression of the interleukin-2 receptor (α -, β -, and γ -chain) by normal and malignant myeloid cells". Blood, vol. 87, p. 2419-27.

SCHWACHULA, A., D. Riemann, A. Kehlen et J. Langner. 1994. "Characterization of the immunophenotype and functional properties of fibroblast-like synoviocytes in comparison to skin fibroblasts and umbilical vein endothelial cells". Immunobiology, vol. 190, p. 67-92.

SCONOCCHIA, G., L. Campagnano, D. Adorno, A. Iacona, N. Y. Cococetta, V. Boffo, S. Amadori et C. U. Casciani. 2001. "CD44 ligation on peripheral blood polymorphonuclear cells induces interleukin-6 production". Blood, vol. 97, p. 3621-7.

SEDGWICK, A. D. et P. Lees. 1986. "A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat". Agents and Actions, vol. 18, p. 439-46.

SEDGWICK, A. D., A. R. Moore, A. Y. Al-Duaij, J. C. Edwards et D. A. Willoughby. 1985. "The immune response to pertussis in the 6-day air pouch: a model of chronic synovitis". British Journal of Experimental Pathology, vol. 66, p. 455-64.

SEGAL, A. W. 2005. "How neutrophils kill microbes". Annual Review of Immunology, vol. 23, p. 197-223.

SEITZ, M., B. Dewald, N. Gerber et M. Baggiolini. 1991. "Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis". Journal of Clinical Investigation, vol. 87, p. 463-9.

SELYE, H. 1953a. "Use of granuloma pouch technic in the study of antiphlogistic corticoids". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 82, p. 328-33.

SELYE, H. 1953b. "On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury; an experimental study with the granuloma pouch technique". J Am Med Assoc, vol. 152, p. 1207-13.

SEN, M., K. Lauterbach, H. El-Gabalawy, G. S. Firestein, M. Corr et D. A. Carson. 2000. "Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, p. 2791-6.

SHAKOORY, B., S. M. Fitzgerald, S. A. Lee, D. S. Chi et G. Krishnaswamy. 2004. "The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology". Journal of Interferon and Cytokine Research, vol. 24, p. 271-81.

SHAM, R. L., P. D. Phatak, K. A. Belanger et C. H. Packman. 1995. "Functional properties of HL60 cells matured with all-trans-retinoic acid and DMSO: differences in response to interleukin-8 and fMLP". Leukemia Research, vol. 19, p. 1-6.

SHAN, B., L. Yu, O. Shimozato, Q. Li et M. Tagawa. 2004. "Expression of interleukin-21 and -23 in human esophageal tumors produced antitumor effects in nude mice". Anticancer Research, vol. 24, p. 79-82.

SHARON, M., R. D. Klausner, B. R. Cullen, R. Chizzonite et W. J. Leonard. 1986. "Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions". Science, vol. 234, p. 859-63.

SHI, J., H. Fujieda, Y. Kokubo et K. Wake. 1996. "Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver". Hepatology, vol. 24, p. 1256-63.

SHI, J., G. E. Gilbert, Y. Kokubo et T. Ohashi. 2001. "Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils". Blood, vol. 98, p. 1226-30.

SHIBUYA, H., M. Yoneyama, Y. Nakamura, H. Harada, M. Hatakeyama, S. Minamoto, T. Kono, T. Doi, R. White et T. Taniguchi. 1990. "The human interleukin-2 receptor beta-chain gene: genomic organization, promoter analysis and chromosomal assignment". Nucleic Acids Res, vol. 18, p. 3697-703.

SIMON, H. U., S. Yousefi, B. Dibbert, F. Levi-Schaffer et K. Blaser. 1997. "Anti-apoptotic signals of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are transduced via Jak2 tyrosine kinase in eosinophils". European Journal of Immunology, vol. 27, p. 3536-9.

SINGHAL, P. C., P. Patel, N. Nahar, N. Franki, A. Kapasi, K. Reddy, N. Shah, I. E. Nwakoby et B. Mehrotra. 1999. "Ethanol-induced neutrophil apoptosis is mediated through nitric oxide". Journal of Leukocyte Biology, vol. 66, p. 930-6.

SIVORI, S., C. Cantoni, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Conte, L. Moretta et A. Moretta. 2003. "IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors". European Journal of Immunology, vol. 33, p. 3439-47.

SMITH, C. W. 1993. "Leukocyte-endothelial cell interactions". Seminars in Hematology, vol. 30, p. 45-53; discussion 54-5.

SNIDER, G. L., P. J. Stone, E. C. Lucey, R. Breuer, J. D. Calore, T. Seshadri, A. Catanese, R. Maschler et H. P. Schnebli. 1985. "Eglin-c, a polypeptide derived from the medicinal leech, prevents human neutrophil elastase-induced emphysema and bronchial secretory cell metaplasia in the hamster". American Review of Respiratory Disease, vol. 132, p. 1155-61.

STEFFEN, M., J. Petersen, M. Oldigs, A. Karmeier, H. Magnussen, H. G. Thiele et A. Raedler. 1993. "Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1-beta, and interleukin-6 by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 91, p. 939-49.

STEIN, G. M., U. Pfuller et M. Schietzel. 1999. "Viscotoxin-free aqueous extracts from European mistletoe (*Viscum album* L.) stimulate activity of human granulocytes". Anticancer Research, vol. 19, p. 2925-8.

STEVENS, P. et D. E. Piazza. 1990. "Interleukin-2 increases the oxidative activity and induces migration of murine polymorphonuclear leukocytes in vivo". International Journal of Immunopharmacology, vol. 12, p. 605-11.

STOCKLEY, R. A. 2002. "Neutrophils and the pathogenesis of COPD". Chest, vol. 121, p. 151S-155S.

STOECK, M., W. Kromer et V. Gekeler. 1998. "Induction of IL-15 mRNA and protein in A549 cells by pro-inflammatory cytokines". Immunobiology, vol. 199, p. 14-22.

STOECK, M., M. Schafer, H. P. Hofmann et V. Gekeler. 2000. "Dexamethasone and cyclosporin A do not inhibit interleukin-15 expression in the human lung carcinoma cell line A549". European Cytokine Network, vol. 11, p. 414-9.

STOIKA, R., N. Kashchak, M. Lutsik-Kordovsky, M. Boyko et A. Tsyrlunyk. 2001. "In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents". Med Sci Monit, vol. 7, p. 652-8.

STONE, M. J., E. A. Sausville, J. W. Fay, D. Headlee, R. H. Collins, W. D. Figg, M. Stetler-Stevenson, V. Jain, E. S. Jaffe, D. Solomon, R. M. Lush, A. Senderowicz, V. Ghetie, J. Schindler, J. W. Uhr et E. S. Vitetta. 1996. "A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma". Blood, vol. 88, p. 1188-97.

STRENGELL, M., I. Julkunen et S. Matikainen. 2004. "IFN-alpha regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells". Journal of Leukocyte Biology, vol. 76, p. 416-22.

STRENGELL, M., S. Matikainen, J. Siren, A. Lehtonen, D. Foster, I. Julkunen et T. Sareneva. 2003. "IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells". Journal of Immunology, vol. 170, p. 5464-9.

STRENGELL, M., T. Sareneva, D. Foster, I. Julkunen et S. Matikainen. 2002. "IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response". Journal of Immunology, vol. 169, p. 3600-5.

SUGIURA, T., M. Harigai, Y. Kawaguchi, K. Takagi, C. Fukasawa, S. Ohsako-Higami, S. Ohta, M. Tanaka, M. Hara et N. Kamatani. 2002. "Increased IL-15 production of muscle cells in polymyositis and dermatomyositis". International Immunology, vol. 14, p. 917-24.

SUGIYAMA, H., Y. Ono et O. Kunii. 1993. "Effect of recombinant human interleukin-2 on the chemotaxis and chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes". Kansenshogaku Zasshi. Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, vol. 67, p. 1178-82.

SUTO, A., H. Nakajima, K. Hirose, K. Suzuki, S. Kagami, Y. Seto, A. Hoshimoto, Y. Saito, D. C. Foster et I. Iwamoto. 2002. "Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C(epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells". Blood, vol. 100, p. 4565-73.

SUTTMANN, H., N. Lehan, A. Bohle et S. Brandau. 2003. "Stimulation of neutrophil granulocytes with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis". Infection and Immunity, vol. 71, p. 4647-56.

SUZUKI, H., G. S. Duncan, H. Takimoto et T. W. Mak. 1997. "Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain". Journal of Experimental Medicine, vol. 185, p. 499-505.

SUZUKI, K., T. Hasegawa, C. Sakamoto, Y. M. Zhou, F. Hato, M. Hino, N. Tatsumi et S. Kitagawa. 2001. "Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines". Journal of Immunology, vol. 166, p. 1185-92.

SUZUKI, K., M. Hino, F. Hato, N. Tatsumi et S. Kitagawa. 1999. "Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha". Blood, vol. 93, p. 341-9.

SUZUKI, K., H. Nakajima, K. Ikeda, Y. Maezawa, A. Suto, H. Takatori, Y. Saito et I. Iwamoto. 2003. "IL-4-Stat6 signaling induces tristetraprolin expression and inhibits TNF-alpha production in mast cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 198, p. 1717-27.

SUZUKI, K., H. Nakazato, H. Matsui, M. Hasumi, Y. Shibata, K. Ito, Y. Fukabori, K. Kurokawa et H. Yamanaka. 2001. "NK cell-mediated anti-tumor immune response to human prostate cancer cell, PC-3: immunogene therapy using a highly secretable form of interleukin-15 gene transfer". Journal of Leukocyte Biology, vol. 69, p. 531-7.

SWEENEY, J. F., P. K. Nguyen, G. M. Omann et D. B. Hinshaw. 1997. "Ultraviolet irradiation accelerates apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes: protection by LPS and GM-CSF". Journal of Leukocyte Biology, vol. 62, p. 517-23.

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.

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.

TAKAGI, J. et T. A. Springer. 2002. "Integrin activation and structural rearrangement". Immunological Reviews, vol. 186, p. 141-63.

TAKEDA, Y., J. Fu, K. Suzuki, D. Sendo, T. Nitto, F. Sendo et Y. Araki. 2003. "Expression of GPI-80, a beta2-integrin-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, requires neutrophil differentiation with dimethyl sulfoxide in HL-60 cells". Experimental Cell Research, vol. 286, p. 199-208.

TAKESHITA, T., H. Asao, K. Ohtani, N. Ishii, S. Kumaki, N. Tanaka, H. Munakata, M. Nakamura et K. Sugamura. 1992. "Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor". Science, vol. 257, p. 379-82.

TAMBY, M. C., Y. Chauseaud, L. Guillevin et L. Mouthon. 2003. "New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis". Autoimmun Rev, vol. 2, p. 152-7.

TAN, J. T., B. Ernst, W. C. Kieper, E. LeRoy, J. Sprent et C. D. Surh. 2002. "Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 195, p. 1523-32.

TANAKA, H., E. Abe, C. Miyaura, T. Kuribayashi, K. Konno, Y. Nishii et T. Suda. 1982. "1 alpha,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60)". Biochemical Journal, vol. 204, p. 713-9.

TANEJA, R., J. Parodo, S. H. Jia, A. Kapus, O. D. Rotstein et J. C. Marshall. 2004. "Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity". Critical Care Medicine, vol. 32, p. 1460-9.

TASCINI, C., F. Baldelli, C. Monari, C. Retini, D. Pietrella, D. Francisci, F. Bistoni et A. Vecchiarelli. 1996. "Inhibition of fungicidal activity of polymorphonuclear leukocytes from HIV-infected patients by interleukin (IL)-4 and IL-10". AIDS, vol. 10, p. 477-83.

TAVIAN, M. et B. Peault. 2005. "Embryonic development of the human hematopoietic system". International Journal of Developmental Biology, vol. 49, p. 243-50.

TAYLOR, P. C., A. M. Peters, E. Paleolog, P. T. Chapman, M. J. Elliott, R. McCloskey, M. Feldmann et R. N. Maini. 2000. "Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis". Arthritis and Rheumatism, vol. 43, p. 38-47.

TESSIER, P. A., P. H. Naccache, I. Clark-Lewis, R. P. Gladue, K. S. Neote et S. R. McColl. 1997. "Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha". Journal of Immunology, vol. 159, p. 3595-602.

THORNBERRY, N. A. et Y. Lazebnik. 1998. "Caspases: enemies within". Science, vol. 281, p. 1312-6.

THULESEN, S., M. Nielsen, T. R. Petersen, M. Holst Nissen, N. Odum et C. Ropke. 2000. "Interleukin 15 is a growth factor for human thymocytes with preferential effect on CD8(+)cells". Cytokine, vol. 12, p. 751-5.

THURKOW, E. W., I. M. van der Heijden, F. C. Breedveld, T. J. Smeets, M. R. Daha, P. M. Kluin, A. E. Meinders et 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". Journal of Pathology, vol. 181, p. 444-50.

TIKU, K., M. L. Tiku et J. L. Skosey. 1986. "Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils". Journal of Immunology, vol. 136, p. 3677-85.

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.

TO, S. S., P. M. Newman, V. J. Hyland, B. G. Robinson et L. Schrieber. 1996. "Regulation of adhesion molecule expression by human synovial microvascular endothelial cells in vitro". Arthritis and Rheumatism, vol. 39, p. 467-77.

TOKUSHIGE, K., K. Hasegawa, K. Yamauchi et N. Hayashi. 2002. "Analysis of natural killer cells and interleukin-15 in patients with acute and fulminant hepatitis". Hepato Res, vol. 23, p. 31-37.

- TOMONAGA, M., J. C. Gasson, S. G. Quan et D. W. Golde. 1986. "Establishment of eosinophilic sublines from human promyelocytic leukemia (HL-60) cells: demonstration of multipotentiality and single-lineage commitment of HL-60 stem cells". Blood, vol. 67, p. 1433-41.
- TONNESEN, M. G. 1989. "Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium". Journal of Investigative Dermatology, vol. 93, p. 53S-58S.
- TOOMEY, J. A., F. Gays, D. Foster et C. G. Brooks. 2003. "Cytokine requirements for the growth and development of mouse NK cells in vitro". Journal of Leukocyte Biology, vol. 74, p. 233-42.
- TOURKOVA, I. L., Z. R. Yurkovetsky, A. Gambotto, V. P. Makarenkova, L. Perez, L. Balkir, P. D. Robbins, M. R. Shurin et G. V. Shurin. 2002. "Increased function and survival of IL-15-transduced human dendritic cells are mediated by up-regulation of IL-15 α and Bcl-2". Journal of Leukocyte Biology, vol. 72, p. 1037-45.
- TOUW, I. P., J. P. De Koning, A. C. Ward et M. H. Hermans. 2000. "Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease". Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 160, p. 1-9.
- TRAYNER, I. D., T. Bustorff, A. E. Etches, G. J. Mufti, Y. Foss et F. Farzaneh. 1998. "Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, α 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate". Leukemia Research, vol. 22, p. 537-47.
- TRENTIN, L., A. Cerutti, R. Zambello, R. Sancetta, 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.
- TROUGHTON, P. R., R. Platt, H. Bird, E. el-Manzalawi, M. Bassiouni et V. Wright. 1996. "Synovial fluid interleukin-8 and neutrophil function in rheumatoid arthritis and seronegative polyarthritis". British Journal of Rheumatology, vol. 35, p. 1244-51.
- TSIFTSOGLU, A. S., I. S. Pappas et I. S. Vizirianakis. 2003. "Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells". Pharmacology and Therapeutics, vol. 100, p. 257-90.
- TSUNOBUCHI, H., H. Nishimura, F. Goshima, T. Daikoku, H. Suzuki, I. Nakashima, Y. Nishiyama et Y. Yoshikai. 2000. "A protective role of interleukin-15 in a mouse model for systemic infection with herpes simplex virus". Virology, vol. 275, p. 57-66.
- UEDA, C., T. Akasaka, M. Kurata, Y. Maesako, M. Nishikori, R. Ichinohasama, K. Imada, T. Uchiyama et H. Ohno. 2002. "The gene for interleukin-21 receptor is the partner of BCL6 in t(3;16)(q27;p11), which is recurrently observed in diffuse large B-cell lymphoma". Oncogene, vol. 21, p. 368-76.

UEDA, M., K. Imada, A. Imura, H. Koga, M. Hishizawa et T. Uchiyama. 2005. "Expression of functional interleukin-21 receptor on adult T-cell leukaemia cells". British Journal of Haematology, vol. 128, p. 169-76.

UGAI, S., O. Shimozato, K. Kawamura, Y. Q. Wang, T. Yamaguchi, H. Saisho, S. Sakiyama et M. Tagawa. 2003a. "Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts". Cancer Gene Therapy, vol. 10, p. 187-92.

UGAI, S., O. Shimozato, L. Yu, Y. Q. Wang, K. Kawamura, H. Yamamoto, T. Yamaguchi, H. Saisho, S. Sakiyama et M. Tagawa. 2003b. "Transduction of the IL-21 and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and -independent antitumor effects". Cancer Gene Therapy, vol. 10, p. 771-8.

UGUCCIONI, M., M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald et M. Baggiolini. 1995. "Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes". European Journal of Immunology, vol. 25, p. 64-8.

UMEMURA, M., K. Hirose, W. Wajjwaiku, H. Nishimura, T. Matsuguchi, Y. Gotoh, M. Takahashi, M. Makino et Y. Yoshikai. 2001a. "Impaired IL-15 production associated with susceptibility of murine AIDS to mycobacterial infection". Journal of Leukocyte Biology, vol. 69, p. 138-48.

UMEMURA, M., H. Nishimura, K. Hirose, T. Matsuguchi et Y. Yoshikai. 2001b. "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.

VAINER, B., O. H. Nielsen, J. Hendel, T. Horn et I. Kirman. 2000. "Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease". Cytokine, vol. 12, p. 1531-6.

VAN LEEUWEN, E. M., L. E. Gamadia, P. A. Baars, E. B. Remmerswaal, I. J. ten Berge et R. A. van Lier. 2002. "Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8+ T cells". Journal of Immunology, vol. 169, p. 5838-43.

VAN LEEUWEN, M. A., J. Westra, P. C. Limburg, P. L. van Riel et M. H. van Rijswijk. 1995. "Interleukin-6 in relation to other proinflammatory cytokines, chemotactic activity and neutrophil activation in rheumatoid synovial fluid". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 54, p. 33-8.

VEDDER, N. B. et J. M. Harlan. 1988. "Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium". Journal of Clinical Investigation, vol. 81, p. 676-82.

VEHMEYER, K., T. Hajto, K. Hostanska, S. Konemann, H. Loser, R. Saller et B. Wormann. 1998. "Lectin-induced increase in clonogenic growth of haematopoietic progenitor cells". European Journal of Haematology, vol. 60, p. 16-20.

VILLUNGER, A., L. A. O'Reilly, N. Holler, J. Adams et A. Strasser. 2000. "Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes". Journal of Experimental Medicine, vol. 192, p. 647-58.

VINUESA, C. G., M. C. Cook, C. Angelucci, V. Athanasopoulos, L. Rui, K. M. Hill, D. Yu, H. Domaschitz, B. Whittle, T. Lambe, I. S. Roberts, R. R. Copley, J. I. Bell, R. J. Cornall et C. C. Goodnow. 2005. "A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity". Nature, vol. 435, p. 452-8.

VIRELIZIER, J. L. et F. Arenzana-Seisdedos. 1985. "Immunological functions of macrophages and their regulation by interferons". Medical Biology, vol. 63, p. 149-59.

VITALE, M., A. Bassini, P. Secchiero, P. Mirandola, C. Ponti, L. Zamai, A. R. Mariani, M. Falconi et G. Azzali. 2002. "NK-active cytokines IL-2, IL-12, and IL-15 selectively modulate specific protein kinase C (PKC) isoforms in primary human NK cells". Anatomical Record, vol. 266, p. 87-92.

VOLLMER, T. L., R. Liu, M. Price, S. Rhodes, A. La Cava et F. D. Shi. 2005. "Differential effects of IL-21 during initiation and progression of autoimmunity against neuroantigen". Journal of Immunology, vol. 174, p. 2696-701.

VON STEBUT, E., M. Metz, G. Milon, J. Knop et M. Maurer. 2003. "Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha /beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha". Blood, vol. 101, p. 210-5.

VONDRACEK, J., M. A. Sheard, P. Krejci, K. Minksova, J. Hofmanova et A. Kozubik. 2001. "Modulation of death receptor-mediated apoptosis in differentiating human myeloid leukemia HL-60 cells". Journal of Leukocyte Biology, vol. 69, p. 794-802.

VOSE, J. M. et J. O. Armitage. 1995. "Clinical applications of hematopoietic growth factors". Journal of Clinical Oncology, vol. 13, p. 1023-35.

VOSSHENRICH, C. A., T. Ranson, S. I. Samson, E. Corcuff, F. Colucci, E. E. Rosmaraki et J. P. Di Santo. 2005. "Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo". Journal of Immunology, vol. 174, p. 1213-21.

WALLSTROM, J., A. K. Andersson et S. Sandler. 2003. "Effects of interleukin-15 on suppression of rat pancreatic islets in vitro induced by proinflammatory cytokines". Immunology Letters, vol. 88, p. 141-5.

WALZ, A., R. Burgener, B. Car, M. Baggiolini, S. L. Kunkel et R. M. Strieter. 1991. "Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8". Journal of Experimental Medicine, vol. 174, p. 1355-62.

WANG, C. R. et M. F. Liu. 2003. "Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis". Clinical and Experimental Immunology, vol. 132, p. 371-8.

WANG, G., M. Tschoi, R. Spolski, Y. Lou, K. Ozaki, C. Feng, G. Kim, W. J. Leonard et P. Hwu. 2003. "In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells". Cancer Research, vol. 63, p. 9016-22.

WANG, H. W., N. Tedla, J. E. Hunt, D. Wakefield et H. P. McNeil. 2005. "Mast cell accumulation and cytokine expression in the tight skin mouse model of scleroderma". Experimental Dermatology, vol. 14, p. 295-302.

WANG, S. Y., L. Y. Chen, S. J. Wang, C. K. Lin et C. K. Ho. 1991. "Growth inhibition and differentiation in HL-60 leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and tumor necrosis factor alpha". Experimental Hematology, vol. 19, p. 1025-30.

WANG, X. et G. P. Studzinski. 2001. "Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) defines the first phase of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of HL60 cells". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 80, p. 471-82.

WARD, C., I. Dransfield, E. R. Chilvers, C. Haslett et A. G. Rossi. 1999. "Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 20, p. 503-9.

WARD, C., J. Murray, A. Clugston, I. Dransfield, C. Haslett et A. G. Rossi. 2005. "Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and extracellular signal-regulated kinase activation in human neutrophils". European Journal of Immunology, vol.

WASHIZU, J., H. Nishimura, N. Nakamura, Y. Nimura et Y. Yoshikai. 1998. "The NF-kappaB binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene". Immunogenetics, vol. 48, p. 1-7.

WATSON, R. W., A. O'Neill, A. E. Brannigen, R. Coffey, J. C. Marshall, H. R. Brady et J. M. Fitzpatrick. 1999. "Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent". FEBS Letters, vol. 453, p. 67-71.

WATSON, R. W., O. D. Rotstein, J. Parodo, R. Bitar, D. Hackam et J. C. Marshall. 1997. "Granulocytic differentiation of HL-60 cells results in spontaneous apoptosis mediated by increased caspase expression". FEBS Letters, vol. 412, p. 603-9.

WATSON, R. W., O. D. Rotstein, J. Parodo, R. Bitar et J. C. Marshall. 1998. "The IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1 beta". Journal of Immunology, vol. 161, p. 957-62.

WEI, S., D. K. Blanchard, J. H. Liu, W. J. Leonard et J. Y. Djeu. 1993. "Activation of tumor necrosis factor-alpha production from human neutrophils by IL-2 via IL-2-R beta". Journal of Immunology, vol. 150, p. 1979-87.

WEI, S., J. H. Liu, D. K. Blanchard et J. Y. Djeu. 1994. "Induction of IL-8 gene expression in human polymorphonuclear neutrophils by recombinant IL-2". Journal of Immunology, vol. 152, p. 3630-6.

WEI, S., J. H. Liu, P. K. Epling-Burnette, A. M. Gamero, D. Ussery, E. W. Pearson, M. E. Elkabani, J. I. Diaz et J. Y. Djeu. 1996. "Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Journal of Immunology, vol. 157, p. 5155-62.

WEI, X. q., M. Orchardson, J. A. Gracie, B. P. Leung, B. m. Gao, H. Guan, W. Niedbala, G. K. Paterson, I. B. McInnes et F. Y. Liew. 2001. "The Sushi domain of soluble IL-15 receptor alpha is essential for binding IL-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses in vitro and in vivo". Journal of Immunology, vol. 167, p. 277-82.

WEINMANN, P., P. Gaetgens et B. Walzog. 1999. "Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3". Blood, vol. 93, p. 3106-15.

WENINGER, W., M. A. Crowley, N. Manjunath et U. H. von Andrian. 2001. "Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 194, p. 953-66.

WERTHEIM, W. A., S. L. Kunkel, T. J. Standiford, M. D. Burdick, F. S. Becker, C. A. Wilke, A. R. Gilbert et R. M. Strieter. 1993. "Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4". Journal of Immunology, vol. 151, p. 2166-75.

WHYTE, M. K., L. C. Meagher, J. MacDermot et C. Haslett. 1993. "Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis". Journal of Immunology, vol. 150, p. 5124-34.

WIDMER, U., K. R. Manogue, A. Cerami et B. Sherry. 1993. "Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines". Journal of Immunology, vol. 150, p. 4996-5012.

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.

WILLEKE, T., J. Schymeinsky, P. Prange, S. Zahler et B. Walzog. 2003. "A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 74, p. 260-9.

WILLIAMS, D. P., M. Pirmohamed, D. J. Naisbitt, J. P. Uetrecht et B. K. Park. 2000. "Induction of metabolism-dependent and -independent neutrophil apoptosis by clozapine". Molecular Pharmacology, vol. 58, p. 207-16.

WINN, R. M., C. Gil-Lamaignere, E. Roilides, M. Simitsopoulou, C. A. Lyman, A. Maloukou et T. J. Walsh. 2005. "Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp". Cytokine, vol. 31, p. 1-8.

WIPKE, B. T. et P. M. Allen. 2001. "Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis". Journal of Immunology, vol. 167, p. 1601-8.

WITKO-SARSAT, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects". Laboratory Investigation, vol. 80, p. 617-53.

WOOD, N., K. Bourque, D. D. Donaldson, M. Collins, D. Vercelli, S. J. Goldman et M. T. Kasaian. 2004. "IL-21 effects on human IgE production in response to IL-4 or IL-13". Cellular Immunology, vol. 231, p. 133-45.

WRIGHT, S. D. et B. C. Meyer. 1986. "Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes". Journal of Immunology, vol. 136, p. 1759-64.

WURSTER, A. L., V. L. Rodgers, A. R. Satoskar, M. J. Whitters, D. A. Young, M. Collins et M. J. Grusby. 2002. "Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 196, p. 969-77.

WUTTGE, D. M., P. Eriksson, A. Sirsjo, G. K. Hansson et S. Stemme. 2001. "Expression of interleukin-15 in mouse and human atherosclerotic lesions". American Journal of Pathology, vol. 159, p. 417-23.

WYLLIE, A. H. 1985. "The biology of cell death in tumours". Anticancer Research, vol. 5, p. 131-6.

YABUKI, M., T. Miyake, Y. Doi, T. Fujiwara, K. Hamazaki, T. Yoshioka, A. A. Horton et K. Utsumi. 1999. "Role of nuclear lamins in nuclear segmentation of human neutrophils". Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR, vol. 31, p. 77-84.

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.

YAJIMA, T., H. Nishimura, S. Sad, H. Shen, H. Kuwano et Y. Yoshikai. 2005. "A novel role of IL-15 in early activation of memory CD8⁺ CTL after reinfection". Journal of Immunology, vol. 174, p. 3590-7.

YAJIMA, T., H. Nishimura, W. Wajjwalku, M. Harada, H. Kuwano et Y. Yoshikai. 2002. "Overexpression of interleukin-15 in vivo enhances antitumor activity against MHC class I-negative and -positive malignant melanoma through augmented NK activity and cytotoxic T-cell response". International Journal of Cancer, vol. 99, p. 573-8.

YAMADA, M., H. Kubo, S. Kobayashi, K. Ishizawa et H. Sasaki. 2004. "Interferon-gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, vol. 287, p. L1042-7.

YAMADA, Y., K. Sugawara, T. Hata, K. Tsuruta, R. Moriuchi, T. Maeda, S. Atogami, K. Murata, K. Fujimoto, T. Kohno, K. Tsukasaki, M. Tomonaga, Y. Hirakata et S. Kamihira. 1998. "Interleukin-15 (IL-15) can replace the IL-2 signal in IL-2-dependent adult T-cell leukemia (ATL) cell lines: expression of IL-15 receptor alpha on ATL cells". Blood, vol. 91, p. 4265-72.

YAMASAKI, S., M. Maeda, K. Ohshima, M. Kikuchi, T. Otsuka et M. Harada. 2004. "Growth and apoptosis of human natural killer cell neoplasms: role of interleukin-2/15 signaling". Leukemia Research, vol. 28, p. 1023-31.

YAMASHITA, K., A. Takahashi, S. Kobayashi, H. Hirata, P. W. Mesner Jr, S. H. Kaufmann, S. Yonehara, K. Yamamoto, T. Uchiyama et M. Sasada. 1999. "Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production". Blood, vol. 93, p. 674-85.

YE, W., J. D. Young et C. C. Liu. 1996. "Interleukin-15 induces the expression of mRNAs of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes". Cellular Immunology, vol. 174, p. 54-62.

YEN, A., M. S. Roberson et S. Varvayanis. 1999. "Retinoic acid selectively activates the ERK2 but not JNK/SAPK or p38 MAP kinases when inducing myeloid differentiation". In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal, vol. 35, p. 527-32.

YEN, A., M. S. Roberson, S. Varvayanis et A. T. Lee. 1998. "Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest". Cancer Research, vol. 58, p. 3163-72.

YOSHIKAI, Y. et H. Nishimura. 2000. "The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections". Microbes Infect, vol. 2, p. 381-9.

YOSHIMURA, T., K. Matsushima, J. J. Oppenheim et E. J. Leonard. 1987. "Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1)". Journal of Immunology, vol. 139, p. 788-93.

YOUNG, D., M. Hegen, M. Senices, Y. Leathurby, L. Albert, M. Whitters, C. Nutter, L. Lowe, B. Sheppard, J. Keith et M. Collins. 2004. "Blockade of interleukin-21 reduces clinical disease in animal models of arthritis". Clinical and Investigative Medicine, vol. 27, No. 4, p. 209C.

YU, C. R., H. A. Young et J. R. Ortaldo. 1998. "Characterization of cytokine differential induction of STAT complexes in primary human T and NK cells". Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, p. 245-58.

ZENG, R., R. Spolski, S. E. Finkelstein, S. Oh, P. E. Kovanen, C. S. Hinrichs, C. A. Pise-Masison, M. F. Radonovich, J. N. Brady, N. P. Restifo, J. A. Berzofsky et W. J. Leonard. 2005. "Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function". Journal of Experimental Medicine, vol. 201, p. 139-48.

ZENG, X., T. A. Moore, M. W. Newstead, R. Hernandez-Alcoceba, W. C. Tsai et T. J. Standiford. 2003. "Intrapulmonary expression of macrophage inflammatory protein 1alpha (CCL3) induces neutrophil and NK cell accumulation and stimulates innate immunity in murine bacterial pneumonia". Infection and Immunity, vol. 71, p. 1306-15.

ZHANG, J. L., D. Foster et W. Sebald. 2003. "Human IL-21 and IL-4 bind to partially overlapping epitopes of common gamma-chain". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 300, p. 291-6.

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.

ZIEGENHAGEN, M. W., M. E. Rothe, M. Schlaak et J. Muller-Quernheim. 2003. "Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis". European Respiratory Journal, vol. 21, p. 407-13.

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.

ZISSEL, G., I. Baumer, M. Schlaak et J. Muller-Quernheim. 2000. "In vitro release of interleukin-15 by broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells from patients with different lung diseases". European Cytokine Network, vol. 11, p. 105-12.

Annexe

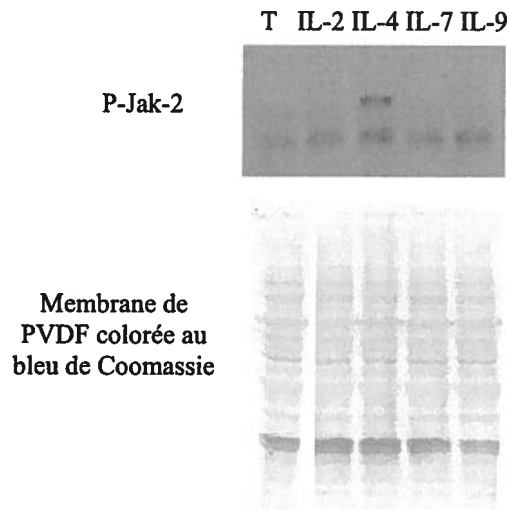


Figure 12 : L'IL-4, contrairement aux IL-2, -7 et -9, induit la phosphorylation de Jak-2 dans les neutrophiles humains. Les neutrophiles (40×10^6 cellules/mL) fraîchement isolés du sang de donneurs sains ont été pré-incubés 15 minutes avec 1 mM de di-isopropylfluorophosphate (DFP) avant d'être stimulés pour 5 minutes avec le tampon (T) ou 250 ng/ml d'IL-2, IL-4, IL-7 et IL-9. La réaction a été arrêtée en ajoutant du tampon de Laemmli bouillant aux cellules. Les échantillons (0.5×10^6 cellules) ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide 10% avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les sites non spécifiques ont été bloqués à l'aide d'une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait écrémé en poudre pour 1h à température pièce. La membrane a été lavée puis incubée pour la nuit à 4°C avec une solution de TBS-Tween contenant 0.5 µg/mL d'anticorps de lapin anti-phospho-Jak-2 (BioSource International, Camarillo, CA). La membrane a été lavée puis incubée pour 1h à température pièce avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé au HRP 1/20,000 dans une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait écrémé en poudre. La membrane a par la suite été lavée puis révélée avec une solution de ECL avant d'être colorée avec une solution de bleu de Coomassie afin de vérifier le chargement des échantillons dans chacun des puits. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

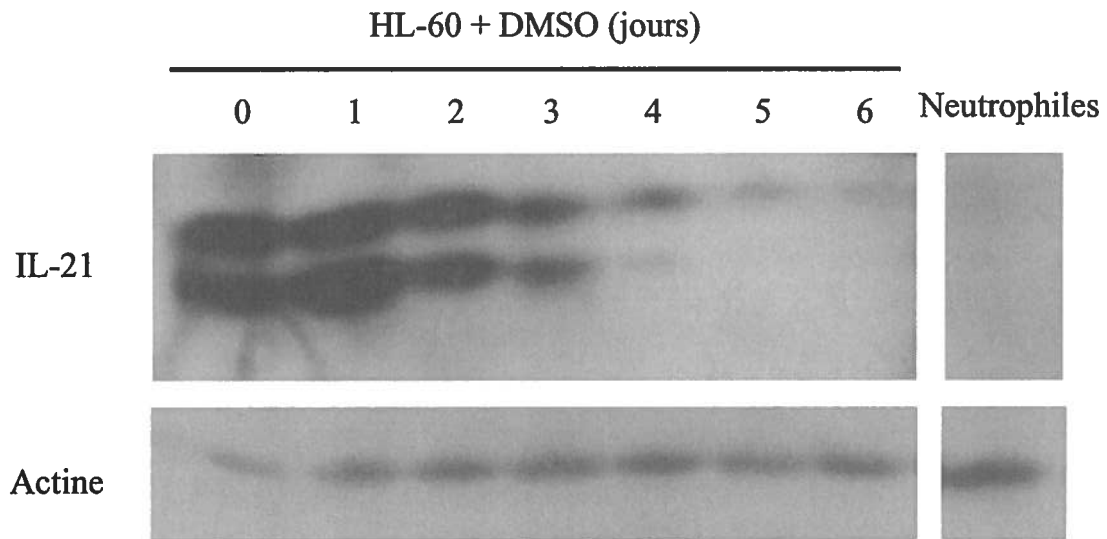


Figure 13 : L'expression de l'IL-21 par les cellules HL-60 est diminuée lors de leur différenciation en neutrophiles. Un aliquot (0.5×10^6 cellules) de cellules HL-60, différenciées en neutrophiles par l'ajout de DMSO (1.25%) au milieu de culture, ou des neutrophiles fraîchement isolés du sang humain a été préparé en ajoutant les cellules à du tampon de Laemmli. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide 10% avant d'être transférés sur une membrane de PVDF. Les sites non spécifiques ont été bloqués à l'aide d'une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait écrémé en poudre pour la nuit à 4°C. La membrane a été lavée puis incubée pour 1h à température pièce avec une solution de TBS-Tween contenant 1 µg/mL d'anticorps de lapin anti-IL-21 (ProSci Inc., San Diego, CA) reconnaissant les acides aminés 121 à 135 de l'IL-21 humaine. La membrane a été lavée puis incubée pour 1h à température pièce avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé au HRP 1/20 000 dans une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait écrémé en poudre. La membrane a par la suite été lavée puis révélée avec une solution de ECL. La membrane a ensuite été réhybridée avec un anticorps anti-actine afin de vérifier le chargement des échantillons dans chacun des puits. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

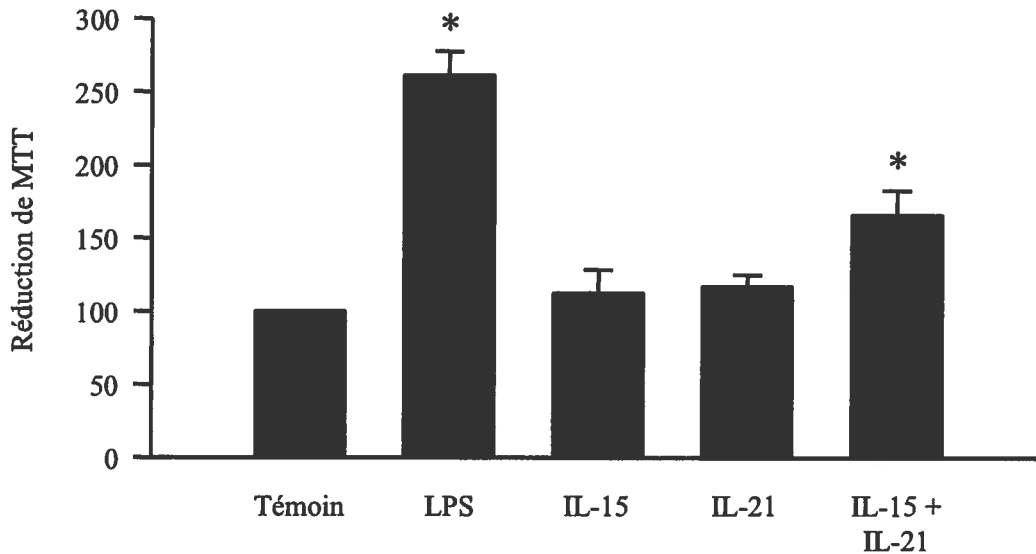


Figure 14 : Effet combiné de l'IL-15 et de l'IL-21 sur l'activité mitochondriale des cellules de la moelle osseuse. Les cellules de la moelle osseuse (0.5×10^6 cellules/mL RPMI-1640 contenant 10% de sérum de veau foetal), isolées à partir des fémurs de souris C57Bl/6, ont été incubées pendant 72h en présence de PBS (Témoin), 100 ng/mL de LPS (LPS), 10 ng/mL d'IL-15 ou d'IL-21 murine ou une combinaison de ces deux cytokines à une concentration de 10 ng/mL (IL-15 + IL-21). Le MTT (concentration finale de 0.5 mg/ml) a ensuite été ajouté dans chacun des puits pour 3h à 37°C. Les plaques ont été centrifugées et du DMSO (200 μ l) a été ajouté aux puits dépourvus de surnageant. L'absorbance a été évalué à 570 nm (longueur d'onde de référence à 690 nm) à l'aide d'un lecteur de micro-plaque. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction de MTT (représentant l'activité mitochondriale) des cellules exposées au PBS (témoin = 100%), moyenne \pm SEM ($n \geq 3$ souris). *, $p < 0.05$ par ANOVA.

