

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre INRS-Institut Armand-Frappier

CARACTÉRISATION DU RÔLE DE L'IL-21 DANS LA BIOLOGIE DES MONOCYTES ET DES MACROPHAGES HUMAINS

Par
Francis Vallières

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

M. Jacques Bernier, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec

Examineur externe

Mme. Caroline Gilbert, PhD
Centre de recherche du CHUL
Université Laval

Examineur externe

M. Mohamed Benderdour, PhD
Centre de recherche de l'HSCM
Université de Montréal

Directeur de recherche

M. Denis Girard, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec

Résumé

L'interleukine (IL)-21 est membre de la famille des cytokines utilisant la chaîne commune γ de récepteur (R) ou le CD132. Cette famille de cytokines est connue pour être parmi les plus étudiées en immunologie. L'IL-21 est principalement sécrétée par les lymphocytes T CD4+ activés, notamment les lymphocytes TFH et TH17, mais également par les cellules NKT. Elle est associée à différentes pathologies inflammatoires et auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et le lupus érythémateux systémique. Bien que l'effet de l'IL-21 soit bien caractérisé dans les cellules d'origine lymphoïdes, le rôle biologique du système IL-21/IL-21R dans les monocytes et les macrophages humains demeure peu documenté. Dans cette étude, nous avons approfondi les connaissances sur l'effet de l'IL-21 dans la biologie des monocytes et des macrophages humains en évaluant sa capacité à moduler certaines de leurs fonctions. D'abord, nous avons confirmé l'expression de l'IL-21R à la surface de la lignée cellulaire THP-1, des monocytes humains et des macrophages différenciés à partir de monocytes humains en présence de GM-CSF (MDMH). Puis, nos résultats montrent que l'IL-21 augmente la capacité de ces cellules à exercer la phagocytose effectuée par l'entremise des récepteurs Fc. L'augmentation de la phagocytose n'était pas associée à un accroissement de l'expression du CD16, du CD32, du CD64, ni de celle de l'IL-21R par l'IL-21. L'IL-21 active la voie Jak/STAT, celle des MAPK (ERK et p38), celle de la PI3K/Akt et Syk tel que montré par l'augmentation de leur niveau de phosphorylation. Également, une association constitutive entre l'IL-21R α et Syk a été observée. Conséquemment, le rôle de l'activation de Syk, de ERK 1/2 de la voie Jak/STAT et de la PI3K/Akt dans l'augmentation des capacités phagocytaires en réponse à l'IL-21 dans ces cellules a été validé par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. De surcroît, l'IL-21 accroît la phagocytose de particule de zymosan par les MDMH. Cette dernière dépend également de l'activation des mêmes voies de signalisation. L'IL-21 ne module toutefois pas l'endocytose, la phagocytose de bactéries et ni celle de particules de zymosan par les monocytes humains. Nos résultats montrent aussi que l'IL-21 n'est pas un agent chimioattractant pour les monocytes humains. Elle accroît cependant l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, et ce de manière dépendante de l'activation de Syk. Finalement l'IL-21 stimule la sécrétion de MMP-9 par les MDMH. L'IL-21 possède donc des effets biologiques significatifs dans les monocytes et les macrophages humains. Par conséquent, le développement de stratégies thérapeutiques ciblant le système IL-21/IL-21R devra considérer que la physiologie des monocytes et des macrophages peut en être affectée.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Denis Girard, mon directeur de recherche. Merci, Denis pour ta confiance et la liberté que tu m'as données afin de mener à terme un projet de recherche aussi passionnant. Merci aussi pour ta disponibilité, ton écoute et tes précieux conseils. Grâce à toi, je ne pourrai plus jamais jouer au hockey sans entendre au creux de ma tête, ta voix qui crie : « aller, répare ta gaffe ». Pour cela, je te remercie du plus profond de mon cœur !

J'aimerais également remercier les nombreux collègues que j'ai côtoyés et sans qui les journées passées au laboratoire n'auraient jamais été aussi agréables. Merci à Bruno Johnson, Théo Stafford-Richard, Jean-Christophe Simard, Claudie Noël, Isabelle Durocher, Maxim Murphy-Marion, Pascal Chhay, Guillaume Ricaud, Rafael de Liz, Luis-Rafael Silva, Marie-Michelle Simon, David Garcês-Gonçalves, Kim Babin, Francis Antoine et Michelle Poirier.

Un merci particulier à Bernard Angers qui m'a donné ma première chance en recherche et avec qui j'ai appris les rudiments de la profession de chercheur. Merci à mes collègues de l'époque Rachel Massicotte, Frédéric Cyr, Christelle Leung, Martin Laporte et Emily Castonguay. Merci également à Annie Angers qui m'a également supervisé mes premiers pas en tant que scientifique.

Un merci spécial à mon père Richard, à ma mère Christiane et à mes beaux-parents Lyne et Serge pour le support dont vous avez fait preuve tout au long de mon long parcours académique.

Finalement, j'aimerais remercier mon épouse, Julie, avec qui je partage ma vie depuis les 13 dernières années. Merci de m'avoir supporté dans tous les aléas que comprends entreprendre des études de doctorat. Merci de m'avoir permis de devenir une meilleure personne et un papa comblé. Qui aurait cru que notre parcours atypique comprenant un cours d'anglais au CÉGEP changerait nos vies à ce point !

Tables des matières

Résumé.....	iii
Remerciements	v
Tables des matières	vii
Liste des abréviations.....	xi
Liste des figures	xvii
Liste des tableaux	xix
Introduction	xxi
SECTION 1 : SYNTHÈSE	1
CHAPITRE 1 : L'INTERLEUKINE 21.....	3
1.1 Les cytokines utilisant la chaîne γ_c	3
1.2 L'importance de la chaîne γ_c en immunologie	4
1.3 L'Interleukine 21	5
1.3.1 Caractéristique de l'IL-21	5
1.3.2 Expression de l'IL-21	6
1.4 Le récepteur de l'IL-21	7
1.4.1 Caractéristique de l'IL-21R	7
1.4.2 Expression de l'IL-21	7
1.5 Voies de signalisations activées par l'IL-21	9
1.5.1 La voie des Jak/STAT	9
1.5.2 La famille des SOCS	10
1.5.3 La voie des MAPK.....	11
1.5.4 La voie de la PI3K/Akt	11
1.6 Modification génétique de la signalisation à l'IL-21chez la souris.....	13
1.6.1 Souris KO pour l'IL-21 et son récepteur.....	13
1.6.2 Souris surexprimant l'IL-21	14
1.6.3 Perte de fonction de l'IL-21 et l'IL-21R chez l'humain	16
CHAPITRE 2 : EFFET DE L'IL-21 SUR LES LEUCOCYTES	19
2.1 Cellules d'origine myéloïde.....	19
2.1.1 Monocytes.....	19
2.1.2 Macrophages.....	19
2.1.3 Cellules dendritiques	22

2.1.4 Neutrophiles	26
2.1.5 Mastocytes	27
2.1.6 Mégacaryocyte	27
2.2 Cellules lymphoïdes.....	29
2.2.1 Lymphocytes B.....	29
2.2.2 Lymphocytes T CD8+	30
2.2.3 Lymphocytes T CD4+	32
2.2.4 Cellules NK.....	34
2.2.5 Cellules NKT	35
Chapitre 3 : L'IL-21 ET LES MALADIES INFLAMMATOIRES	37
3.1 Arthrite rhumatoïde	37
3.2 Lupus érythémateux systémique.....	38
3.3 Les maladies inflammatoires de l'intestin.....	40
CHAPITRE 4 : LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES.....	43
4.1 Les monocytes	43
4.2 Les macrophages	44
4.3 Les fonctions biologiques et cellulaires des monocytes et des macrophages	50
4.3.1 Les monocytes et les macrophages dans la réponse inflammatoire	50
4.3.2 Le recrutement des monocytes.....	52
4.3.3 La phagocytose	54
4.3.3.1 La phagocytose effectuée par l'entremise des récepteurs FcRγ	58
4.3.3.2 La phagocytose par les lectines.....	59
4.3.3.3 La phagocytose par les récepteurs du complément.....	60
4.3.3.4 La phagocytose par les récepteurs scavenger.....	60
4.3.3.5 La phagocytose de cellules apoptotiques	61
4.3.4 La sécrétion de métalloprotéases de la matrice	63
4.3.5 La sécrétion de cytokines	64
Hypothèse du projet de recherche.....	67
Objectifs du projet de recherche.....	69
Objectif général.....	69
Objectifs spécifiques	69
SECTION 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES	71
Article 1	73
Résumé de l'article 1 en français	75

Article 2	87
Résumé de l'article 2 en français.....	89
Article 3	101
Résumé de l'article 3 en français.....	103
SECTION 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION	129
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION	131
5.1 L'IL-21 module les fonctions des monocytes et des macrophages.....	131
5.1.1 Expression du récepteur dans les monocytes et les macrophages.....	132
5.1.2 Voies de signalisation activées par l'IL-21 dans les monocytes et les macrophages.....	133
5.1.3 L'IL-21 favorise le recrutement des monocytes.....	134
5.1.4 L'IL-21 module la phagocytose des monocytes et des macrophages	136
5.1.5 L'IL-21 stimule la sécrétion de MMP-9 par les macrophages.....	137
5.1.6 L'IL-21 ne module pas la sécrétion de cytokines de façon importante	138
5.2 Limitation du projet de recherche	139
5.2.1 Les modèles d'études.....	139
5.2.2 Voies de signalisation et inhibiteurs pharmacologiques	140
5.3 Perspectives	140
5.4 Conclusion	142
Références	145
Annexe 1	177

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	<i>Activation-induced cytidine desaminase</i>
Akt	Protéine kinase B
AM	<i>Alveolar macrophage</i> ; macrophage alvéolaire
AR	Arthrite rhumatoïde
ARNm	Acide ribonucléique messager
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6</i>
BCR	Récepteur des cellules B
Blimp-1	<i>B-lymphocyte induced maturation protein 1</i>
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD132	Chaîne gamma du récepteur de l'Interleukine 2, γ_c
CD360	Chaîne α du récepteur de l'IL-21
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
CFU-GM	<i>Colony forming unit-granulocyte monocyte</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CpG	Cytosine–phosphate–guanine
CR	Récepteur du complément
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
CTL	Lymphocyte T CD8+ cytotoxique
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
DC	Cellule dendritique

DSS-TNBS	<i>Dextran sodium sulfate - 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid</i>
Eomes	<i>Eomesodermin</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
EST	<i>Express sequence tag</i>
FasL	<i>Fas-ligand</i>
FcR	Récepteur de la portion constante des immunoglobulines
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-Colony stimulating factor</i>
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
HSC	Hypersensibilité de contact
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICOS	<i>Inductible T-cell costimulator</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL-21 ^{-/-}	Perte de l'expression de l'IL-21
IL-21 _{iso}	Isoforme de l'IL-21
IL-21R α ^{-/-}	Perte de l'expression de la chaîne IL-21R α
IL-21R	Récepteur de l'IL-21 fonctionnel ; chaîne IL-21R α et γ c
IL-21R.FC	Protéine de fusion composée du domaine extracellulaire de l'IL-21R α combiné à la portion Fc des Ig
IRF4	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Jak	Janus kinase
JNK	<i>C-jun NH₂-terminal kinase</i>
kb	Kilo base

KLH	<i>Keyhole limpet haemocyanin</i>
KO	Knock-out, modifier génétiquement pour ne pas exprimer une protéine
KSL	Cellule souche hématopoïétique KIT+, Sca-1+ et Lyn +
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> ; CD18/CD11a
LPS	Lipopolysaccharide
MAC-1	<i>Macrophage-1 antigen</i> ; CD18/CD11b; CR3
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MARCO	<i>Macrophage receptor with collagenous structure</i>
MAT	Macrophage associé aux tumeurs
MC	Maladie de Crohn
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDMH	Macrophage dérivé de monocyte humain
MDMO	Macrophage dérivé de la moelle osseuse
MII	Maladies inflammatoires de l'intestin
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MKK	MAPK kinase
MKKK	MAPK kinase kinase
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MO-DC	Cellule dendritique dérivée de monocyte
MR	Récepteur du mannose
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> ; facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NFκB	<i>Nuclear factor-kappa B</i> ; facteur nucléaire kappa B
NK	<i>Natural killer cell</i> ; cellule tueuse naturelle

NKT	<i>Natural killer T cell</i> ; cellule T tueuse naturelle.
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
NO	Oxyde nitrique
NOD	<i>Nucleotide-binding association domain</i>
OVA	Ovalbumine
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PHA	Phytohémagglutinine
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3-4,5-trisphosphate
PKB	Protéine kinase B
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PS	Phosphatidylsérine
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
PSR	Récepteur de la phosphatidylsérine
R	Récepteur
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
ROR γ T	Récepteur nucléaire orphelin relié à l'acide rétinoïque
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SCID	Syndrome d'immunodéficience combinée sévère
SLE	Lupus érythémateux systémique
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signalling</i>
SP-1	<i>Specificity protein 1</i>
SR	Récepteur « scavenger »

STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> , récepteur des cellules T
T _{FH}	Cellules T <i>Follicular helper</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>Lymphocyte T helper</i>
Thr-Xaa-Tyr	Motif composé de Thréonine- Xaa- Tyrosine, Xaa représente Glutamine, Glycine et Proline pour les ERK, p38 et JNK respectivement
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TLR	Récepteur <i>toll-like</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> , facteur nécrosant des tumeurs
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSP	Thrombospondine
Tyk 2	Tyrosine kinase 2
VCAM	<i>Vascular adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i> ; CD29/CD49d
WSXWS	Motif composé de Tryptophane-Sérine- x -Tryptophane-Sérine, x représente n'importe lequel des acides aminés
α-GalCer	α-galactosylceramide
γc	Chaîne gamma du récepteur de l'Interleukine 2, CD132
μm	Micromètre

Liste des figures

- Figure 1 :** Les récepteurs des cytokines dépendantes de la chaîne γc
- Figure 2 :** Les principales voies de signalisation activées par l'IL-21
- Figure 3 :** Effets de l'IL-21 sur les fonctions des leucocytes
- Figure 4 :** Dénomination et principaux rôles biologiques des macrophages résidents selon les tissus
- Figure 5 :** Diversité des fonctions biologiques des macrophages en réponse à différents stimuli
- Figure 6 :** Les conséquences physiologiques et pathologiques en fonction de l'agent pro-inflammatoire
- Figure 7 :** Étapes du recrutement des monocytes aux sites inflammatoires
- Figure 8 :** Principaux signaux de reconnaissance, les récepteurs impliqués dans la phagocytose et leurs implications dans la réponse inflammatoire
- Figure 9 :** Principales étapes de la phagocytose

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Phénotypes des souris génétiquement modifiées pour la signalisation à l'IL-21
- Tableau 2 :** Phénotypes humains d'une perte de fonction en signalisation à l'IL-21
- Tableau 3 :** Essais cliniques ciblant la signalisation de l'IL-21
- Tableau 4 :** Caractérisation et fonctions des différents sous-types de monocytes
- Tableau 5 :** Molécules impliquées dans le recrutement des monocytes
- Tableau 6 :** Récepteurs impliqués dans la phagocytose

Introduction

Des millions de personnes sont atteintes de maladies inflammatoires chroniques ou auto-immunes. Ces maladies sont donc un enjeu de santé publique majeur et accaparent une portion significative des efforts de recherche. Leurs causes sont multifactorielles et, par conséquent, difficilement identifiables. Les cytokines sont de petites molécules de signalisation qui jouent des rôles essentiels dans le développement et l'activation du système immunitaire. La modification de l'expression des cytokines est souvent associée au développement de telles maladies. L'interleukine (IL)-21 est le plus récent membre découvert d'une des familles de cytokines les plus étudiées en immunologie. Elle est associée au développement de diverses maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde (AR), le lupus érythémateux et les maladies inflammatoires de l'intestin. Quoique son implication ait été identifiée, son rôle exact dans la pathogenèse de ces maladies demeure mal défini et fait encore l'objet d'investigations.

Les monocytes et les macrophages sont deux acteurs de premier plan de la réponse inflammatoire. Ils contribuent, entre autres, aux étapes d'initiation et de résolution de l'inflammation ce qui fait d'eux des suspects potentiels pouvant contribuer significativement au développement des maladies inflammatoires chroniques. Bien que l'IL-21, les monocytes et les macrophages soient impliqués dans la pathogenèse de différentes maladies inflammatoires, l'effet de cette cytokine sur ces cellules a été, jusqu'à maintenant, très peu étudié. Au cours des dernières années, il a été montré que l'IL-21 pouvait moduler certaines fonctions des monocytes et des macrophages. Le présent projet de doctorat a donc pour principal objectif d'étudier la capacité de l'IL-21 à moduler la phagocytose, le recrutement des monocytes, la sécrétion de métalloprotéases et la sécrétion de cytokines en réponse à l'IL-21. De plus, les voies de signalisation impliquées dans cette modulation seront déterminées. Plusieurs de ces fonctions, par exemple la sécrétion de métalloprotéases et la sécrétion de cytokines par les macrophages sont intimement liées aux dommages observés dans la majorité des maladies inflammatoires mentionnées précédemment. Ainsi toutes molécules régulant ces fonctions sont susceptibles d'exacerber ces pathologies.

Faisant office de pionnier dans ce domaine de recherche, ce projet de doctorat permettra d'accroître les connaissances globales de l'impact de l'IL-21 sur la physiologie des monocytes et des macrophages humains. À terme, elles pourront servir de base dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques ou à mieux anticiper les effets d'une stratégie visant le système IL-21/IL-21 récepteur.

Cette thèse est divisée en trois sections. D'abord, la première section consiste en une revue de littérature traitant des principales caractéristiques de l'IL-21 de même de ses rôles biologiques dans les différentes populations de leucocytes. Cette section abordera également l'implication de cette cytokine dans différentes pathologies en se focalisant sur les maladies inflammatoires et auto-immunes. Une définition des monocytes et des macrophages humains, incluant une description sommaire de leurs fonctions, complète la revue de littérature. La deuxième section présente les trois articles traitant les résultats concernant le rôle de l'IL-21 dans la modulation des fonctions des monocytes et des macrophages humains. La troisième et dernière section comprend une discussion et une conclusion qui permettent de souligner l'apport scientifique des principaux résultats et de quantifier l'apport scientifique de ce projet de recherche.

SECTION 1 : SYNTHÈSE

CHAPITRE 1 : L'INTERLEUKINE 21

1.1 Les cytokines utilisant la chaîne γ c

Lorsque l'organisme subit un stress ou lorsqu'il rencontre un pathogène, plusieurs mécanismes de défense sont déployés afin d'orchestrer une réponse, qui ultimement, permettra le retour à l'homéostasie. Afin d'assurer une coordination efficace des actions des différentes cellules requises dans cette réponse, une panoplie de médiateurs solubles seront sécrétés. Ils procurent ainsi une communication adéquate entre les différents acteurs impliqués. Dans le cas d'une infection, ces médiateurs solubles participent activement à la mobilisation de la réponse immune tout en favorisant l'atténuation de la réponse inflammatoire et le retour à l'homéostasie une fois que le pathogène sera éliminé (Medzhitov, 2008).

Les cytokines sont de petites molécules peptidiques sécrétées notamment par les cellules immunitaires, mais également par d'autres types cellulaires. Elles jouent un rôle essentiel en immunologie en contribuant de manière significative à la maturation, la prolifération, l'activation et la survie de nombreux leucocytes. Elles sont regroupées en diverses familles en fonction de leurs caractéristiques. La famille des cytokines de types I est, entre autres, caractérisée par une structure composée de quatre hélices- α et regroupe plusieurs interleukines (IL), des facteurs stimulant les colonies (CSF) de même que d'autres molécules comme l'érythropoïétine, l'hormone de croissance et la prolactine (Leonard *et al.*, 2000).

Parmi ce dernier groupe, la famille des cytokines dont le récepteur est dépendant de la chaîne γ c est l'une des familles de cytokines les plus importantes en immunologie. Cette famille de cytokines comprend l'IL-2, -4, -7, -9, -15 et plus récemment l'IL-21. Elles sont connues pour transduire leur signal par leur liaison à un récepteur (R) hétérodimérique composé d'une chaîne α spécifique et de la chaîne γ c, à l'exception du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 qui partage une seconde chaîne, soit l'IL-2R β pouvant ainsi former un récepteur hétérotrimérique. L'ensemble des récepteurs de ces cytokines, à l'exception de l'IL-2R α et de l'IL-15R α , fait partie de la superfamille des récepteurs de cytokine de classe I (Kaczmarek *et al.*, 1991) dont les particularités seront brièvement abordées dans la section du récepteur de l'IL-21 (figure 1).

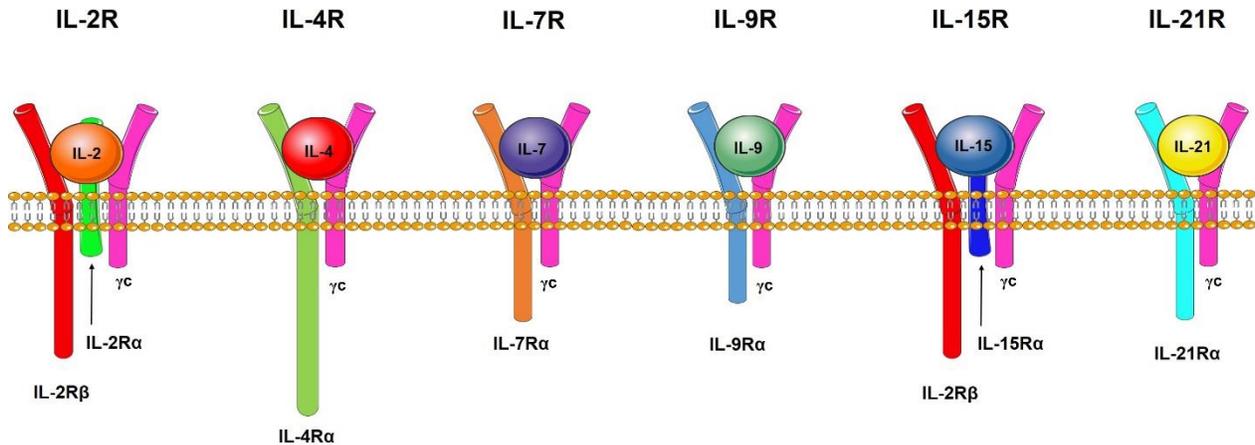


Figure 1 : Les récepteurs des cytokines dépendantes de la chaîne γc . Chacun des récepteurs des cytokines de cette famille partage la chaîne γ du récepteur de l'IL-2 (γc) et une chaîne α spécifique. L'IL-2 et l'IL-15 partagent une seconde chaîne (en plus de la chaîne γc) soit la chaîne β du récepteur de l'IL-2.

Modifiée de (Leonard *et al.*, 2008).

1.2 L'importance de la chaîne γc en immunologie

Les cytokines membres de cette famille jouent un rôle essentiel dans le développement, la maturation et l'activation de différentes cellules immunitaires, dont les cellules T, B et NK. Une altération au niveau de la signalisation cellulaire initiée par ces cytokines peut avoir des répercussions absolument désastreuses (Kovanen *et al.*, 2004, Pelletier *et al.*, 2007a). Par exemple, des mutations survenant dans la portion codante de certains des récepteurs de ces cytokines ou d'intermédiaires de leurs voies de signalisation sont connues pour être la cause de la maladie nommée déficience immunitaire combinée sévère (SCID), popularisée sous l'appellation de la maladie des enfants bulles (Leonard, 1996, Noguchi *et al.*, 1993). Cette maladie est caractérisée par le développement d'un système immunitaire inefficace, notamment en raison des déficits fonctionnels des lymphocytes T et des lymphocytes B, de même qu'une activité cytolytique altérée des cellules NK (Leonard, 2001, Pelletier *et al.*, 2007a). Les personnes atteintes sont contraintes au confinement dans un environnement contrôlé et stérile afin de limiter les contacts potentiels avec des pathogènes, ce qui illustre bien la gravité des conséquences liées à ce déficit immunitaire. Heureusement, une greffe de moelle osseuse peut rétablir l'efficacité du système immunitaire et ainsi guérir la plupart des personnes atteintes (Kovanen *et al.*, 2004). La forme la plus répandue de cette maladie survient en réponse à une mutation de la chaîne γc située

sur le chromosome X (Kovanen *et al.*, 2004). Chez cette forme de la maladie, l'absence de réponse à l'IL-7 et l'IL-15, qui nécessitent toutes deux une chaîne γ c fonctionnelle afin de permettre la liaison de la cytokine et ainsi transduire le signal, seraient responsables du mauvais développement des cellules T et des cellules NK, respectivement (Leonard, 2001). Pour les mêmes raisons, l'absence de signalisation induite par l'IL-4 et l'IL-21 contribuerait principalement aux défaillances observées dans les lymphocytes B des individus atteints de cette maladie (Ozaki *et al.*, 2002).

1.3 L'Interleukine 21

1.3.1 Caractéristique de l'IL-21

L'IL-21 est le plus récent membre de la famille des cytokines dépendantes de la chaîne γ c ayant été découvert. L'IL-21 humaine est une molécule peptidique de 131 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 15 kDa (Parrish-Novak *et al.*, 2000). Elle présente différentes caractéristiques communes aux cytokines de type I, tel qu'une structure en quadruples hélices dont deux sont orientées vers le haut et deux vers le bas (up,up, down, down) (Parrish-Novak *et al.*, 2000). Cette structure a été confirmée par spectrométrie (Bondensgaard *et al.*, 2007) et par cristallographie (Hamming *et al.*, 2012). Elle présente une forte homologie avec l'IL-15, mais également avec d'autres cytokines membres de famille de cytokine utilisant la chaîne γ c telles que l'IL-4 et l'IL-2. Par exemple, elle possède deux paires de résidus cystéine à des positions identiques à l'IL-15 dont une est également partagée avec IL-2, l'IL-4 et le GM-CSF. Les gènes de l'IL-21 et de l'IL-2 sont séparés par environ 180 kb et sont situés sur le chromosome 4q26-27 chez l'humain et sur le chromosome 3 chez la souris (Parrish-Novak *et al.*, 2000). L'IL-21 humaine présente une homologie de 57 % avec son homologue murin (Parrish-Novak *et al.*, 2000). L'hélice C de l'IL-21 est cruciale dans sa liaison avec l'IL-21R puisqu'une fois cette région stabilisée l'activité biologique de l'IL-21 est d'environ dix fois supérieures (Bondensgaard *et al.*, 2007).

Suite à la découverte de l'IL-21, une isoforme de cette cytokine (IL-21_{iso}) a été identifiée et caractérisée (Rahman *et al.*, 2007). Cette isoforme provient d'un épissage alternatif de l'ARN messager de l'IL-21 se traduisant par un ajout d'environ 90pb provenant de l'intron 4 au niveau

de la portion C-terminal. Toutefois, étant donné la présence d'un codon *Stop* dans cet ajout, la protéine traduite à partir de ce nouveau messenger est plus courte de 9 acides aminés. En dépit de cette différence, l'IL-21_{iso} possède une activité biologique relativement équivalente à la forme conventionnelle. Par contre, l'IL-21_{iso} est moins sécrétée que l'IL-21 malgré une transcription similaire. Elle se retrouve plutôt liée à la membrane plasmique où elle est en mesure de se lier à l'IL-21R exprimé à la surface des cellules adjacentes et ainsi engendrer ses effets biologiques (Nara *et al.*, 2013, Rahman *et al.*, 2007). Avec cette découverte, l'ensemble des cytokines dépendantes de la chaîne γ c, à l'exception de l'IL-9, possède au moins une isoforme (Alms *et al.*, 1996, Atamas *et al.*, 1996, Luzina *et al.*, 2011, Nishimura *et al.*, 2005, Nishimura *et al.*, 2000, Tsytsikov *et al.*, 1996, Vudattu *et al.*, 2009).

1.3.2 Expression de l'IL-21

Lors de la découverte de l'IL-21, les études montraient une sécrétion restreinte presque exclusivement aux cellules T CD4⁺ activées (Parrish-Novak *et al.*, 2000). Désormais, les différents types cellulaires sécrétant de l'IL-21 se sont précisés, les plus grands producteurs étant les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (T_{fh}) (Luthje *et al.*, 2012, Tangye *et al.*, 2013), les T_{h17} (Korn *et al.*, 2007, Nurieva *et al.*, 2007, Wei *et al.*, 2007, Zhou *et al.*, 2007) et les cellules NKT activées (Coquet *et al.*, 2007, Harada *et al.*, 2006). Les lymphocytes T CD4⁺ T_{h1} et T_{h2} de même que les lymphocytes T CD8⁺ peuvent également sécréter de l'IL-21 (Chtanova *et al.*, 2004, Frohlich *et al.*, 2009, Mittal *et al.*, 2012, Ortega *et al.*, 2009, Wurster *et al.*, 2002). Plus récemment, il a été rapporté que des cellules d'origine myéloïde, telles que les cellules dendritiques (Moret *et al.*, 2013, Turksma *et al.*, 2013) et les neutrophiles (Thompson *et al.*, 2016) pouvaient également produire de l'IL-21 sous certaines conditions. Différents stimuli peuvent favoriser la sécrétion d'IL-21. Par exemple, la stimulation des récepteurs des cellules T (le TCR), la production d'un influx de calcium, une stimulation avec le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et l'ionomycin, l'interféron (IFN) α/β , l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-21 elles-mêmes mènent tous à la sécrétion d'IL-21 (Kim *et al.*, 2005, Korn *et al.*, 2007, Nurieva *et al.*, 2007, Onoda *et al.*, 2007, Parrish-Novak *et al.*, 2000, Pesce *et al.*, 2006, Strengell *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2007). Les facteurs de transcriptions « Nuclear factor of activated T-cells » (NFAT), « T box express in T cells » (T-bet), et « interferon regulatory factor 4 » (IRF4) régulent de l'expression de l'IL-21 (Huber *et al.*, 2008, Mehta *et al.*, 2005).

1.4 Le récepteur de l'IL-21

1.4.1 Caractéristique de l'IL-21R

Le récepteur de l'IL-21 est un récepteur hétérodimérique composé d'une chaîne spécifique, dénommée IL-21R α ou CD360, et de la chaîne γ . L'IL-21R α a été découvert simultanément par deux groupes à partir d'une banque d'ADN génomique et d'une banque « express sequence tag » (EST) (Ozaki *et al.*, 2000, Parrish-Novak *et al.*, 2000). Le gène, situé sur le chromosome 16p12 tout juste en aval du gène de l'IL-4R α , comprend environ 20 kb codants pour 9 exons et 538 acides aminés (Ozaki *et al.*, 2000, Parrish-Novak *et al.*, 2000). Le gène de IL-21R α s'apparente davantage à celui de la chaîne β du récepteur de l'IL- 2 (27 % homologie) (Ozaki *et al.*, 2000). Finalement, l'IL-21R α humain présente une forte homologie de séquence avec son homologue murin, soit 72 % au niveau de l'ADN et 62 % au niveau de la séquence d'acides aminés (Ozaki *et al.*, 2000, Parrish-Novak *et al.*, 2000). L'IL-21R fait partie de la famille des récepteurs aux cytokines de type I. Tout comme les autres membres de cette famille, son domaine extracellulaire possède quatre résidus cystéine conservés, un motif WSXWS et deux domaines fibronectine de type III. Ces derniers domaines jouent un rôle essentiel dans la liaison entre l'IL-21 et l'IL-21R (Hamming *et al.*, 2012). Dans sa partie intracellulaire se trouve une région Box1/Box2 permettant le recrutement des protéines membres de la famille des tyrosines Janus kinases (Jak) (Leonard *et al.*, 2000). Comme pour d'autres cytokines de la même famille, la chaîne spécifique est suffisante afin de permettre la liaison de la cytokine, l'IL-21, au récepteur. Toutefois la présence de la chaîne γ est nécessaire afin de permettre la transduction du signal (Asao *et al.*, 2001, Habib *et al.*, 2002).

1.4.2 Expression de l'IL-21

L'ARNm de l'IL-21R α a d'abord été principalement détecté dans les tissus lymphoïdes tels que la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques, mais également plus faiblement dans les cellules du sang périphérique, le petit intestin et les poumons (Ozaki *et al.*, 2000, Parrish-Novak *et al.*, 2000) suggérant ainsi une expression dans les cellules originaires de la lignée lymphoïde. Par conséquent, l'expression de l'IL-21R α a d'abord été confirmée dans les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les lymphocytes B et les cellules NK (Ozaki *et al.*, 2000, Parrish-Novak *et al.*, 2000).

Maintenant, certaines études montrent que l'IL-21R α est exprimé par une panoplie de cellules immunitaires ou non immunitaires, telles que les cellules dendritiques (DC) (Brandt *et al.*, 2003a), les monocytes (Pelletier *et al.*, 2004a), les macrophages (Jungel *et al.*, 2004, Pelletier *et al.*, 2004a, Rückert *et al.*, 2008), les cellules NKT (Coquet *et al.*, 2007), les kératinocytes (Distler *et al.*, 2005) et les fibroblastes (Monteleone *et al.*, 2006). Plusieurs lignées cellulaires représentant ces différents types de cellules expriment également l'IL-21R α (Jin *et al.*, 2004, Pelletier *et al.*, 2007a). Ces cellules expriment toutes la chaîne γ c faisant en sorte qu'elles possèdent donc un IL-21R fonctionnel.

L'activation des différents types cellulaires exprimant l'IL-21R α peut moduler son niveau d'expression. Ainsi, dans les lymphocytes T, l'engagement du TCR (Wu *et al.*, 2005), la stimulation avec un anticorps (Ac) anti-CD3 (Jin *et al.*, 2004, Strengell *et al.*, 2004), la PHA (Ozaki *et al.*, 2000), le PMA et l'ionomycine (Wu *et al.*, 2005) et l'IL-21 elle-même (Alves *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2013) vont réguler à la hausse l'expression de l'IL-21R α tandis que l'INF α / β va plutôt inhiber son expression (Strengell *et al.*, 2004). De façon similaire, la stimulation des lymphocytes B avec un Ac anti-CD40, le facteur nécrosant des tumeurs (TNF) et le lipopolysaccharide (LPS) accroît l'expression de l'IL-21R α (Brenne *et al.*, 2002, de Toterò *et al.*, 2006, Jin *et al.*, 2004). Dans les cellules NK, l'expression de l'IL-21R α est augmentée suivant leur stimulation à l'IL-15 (Jin *et al.*, 2004). Finalement, dans les cellules NKT, l'expression de l'IL-21R α est augmentée suivant leur activation avec un Ac anti-CD3 simultanément avec l' α -galactosylceramide (α -GalCer) (Coquet *et al.*, 2007).

Peu d'informations sur les différents mécanismes régulant l'expression du gène de l'IL-21R α sont disponibles à ce jour. Par contre, des études montrent que la séquence consensus permettant la liaison du facteur de transcription SP1, situé dans la région de -20 à -80 bp en amont du site d'initiation de la transcription permet la transcription du gène de l'IL-21R α dans les cellules T (Wu *et al.*, 2005). L'expression de l'IL-21R α par une grande variété de cellules suggère un rôle primordial de l'IL-21 dans la régulation de différents processus immunitaires et une possible implication de cette cytokine dans le développement de diverses maladies. Cet aspect de l'IL-21 sera abordé ultérieurement au chapitre 3.

1.5 Voies de signalisations activées par l'IL-21

1.5.1 La voie des Jak/STAT

La famille des Janus Kinase (Jak) comprend quatre membres chez les mammifères : Jak1, Jak2, Jak3 et la « tyrosine kinase 2 » (Tyk2). Elles sont majoritairement exprimées de manière ubiquitaire à l'exception de l'expression de Jak3 qui est restreinte aux cellules d'origine hématopoïétique, aux cellules des muscles lisses et aux cellules endothéliales. La famille des Jak est impliquée dans la signalisation induite par plus d'une cinquantaine de cytokines, dont l'ensemble des récepteurs des cytokines dépendantes de la chaîne γ_c . Chez ces récepteurs, Jak1 s'associe de manière constitutive à la chaîne spécifique tandis que Jak3 s'associe à la chaîne γ_c . La liaison de la cytokine à son récepteur permet la dimérisation de celui-ci et entraîne l'activation des Jak suivant leur auto ou leur trans phosphorylation (Leonard *et al.*, 1998, Rane *et al.*, 2000, Villarino *et al.*, 2017). Le rôle de la signalisation des Jak par les cytokines dont le récepteur dépend de la chaîne γ_c est, encore une fois, montré chez les personnes atteintes du SCID. En effet, les personnes possédant une mutation « perte de fonction » de Jak3 présentent exactement les mêmes déficiences immunitaires que celle possédant une mutation « perte de fonction » de la chaîne γ_c , ce qui illustre bien le rôle des Jak, particulièrement Jak3, dans la signalisation induite par les cytokines de cette famille (Kovanen *et al.*, 2004). L'activation des Jak mène à la phosphorylation du récepteur ce qui procure un site d'arrimage permettant le recrutement des protéines membre de la famille des « signal transducer and activator of transcription » (STAT). Chez les mammifères dix membres ont été identifiés : STAT1 α , STAT1 β , STAT2, STAT3 α , STAT3 β , STAT4 α , STAT4 β , STAT5a, STAT5b et STAT6 (Rane *et al.*, 2000). Une fois bien arrimées au récepteur, les STAT sont phosphorylées à leur tour permettant ainsi leur homo ou hétérodimérisation. La dimérisation des STAT permet leur translocation au noyau où elles agissent en tant que facteur de transcription des gènes cibles en se liant à l'ADN (figure 2) (Leonard *et al.*, 1998, Rane *et al.*, 2000, Villarino *et al.*, 2017).

Tel que mentionné précédemment, la transduction d'un signal intra cytoplasmique suivant la liaison de l'IL-21 à son récepteur n'est possible que si l'IL-21R α se dimérise avec la chaîne γ_c , bien que l'IL-21R α soit capable de se lier à l'IL-21 en absence de la chaîne γ_c (Asao *et al.*, 2001, Habib *et al.*, 2002, Ozaki *et al.*, 2000). La liaison de l'IL-21 à son récepteur mène à l'activation rapide de Jak1 et Jak3. L'activation des Jak permet le recrutement et l'activation subséquente des

STAT principalement STAT3 et STAT1, mais également STAT5 (a et b) quoique plus faiblement (Asao *et al.*, 2001, Brenne *et al.*, 2002, de Toterio *et al.*, 2006, Gagnon *et al.*, 2007, Habib *et al.*, 2002, Konforte *et al.*, 2006, Ozaki *et al.*, 2000, Rahman *et al.*, 2007, Strengell *et al.*, 2004, Strengell *et al.*, 2003, Strengell *et al.*, 2002, Wendt *et al.*, 2007, Zeng *et al.*, 2007). L'activation de STAT4 a aussi été rapportée, bien que les résultats soient parfois contradictoires (Monteleone *et al.*, 2005, Strengell *et al.*, 2003, Wurster *et al.*, 2002). La tyrosine 510 retrouvée dans le domaine intracellulaire de l'IL-21R α est essentielle pour l'activation des STAT. Cette tyrosine servirait de site d'arrimage pour STAT1 et STAT3 (Zeng *et al.*, 2007). Le rôle de l'activation de STAT3 en réponse à l'IL-21 a, entre autres, été décrit chez les patients ayant une mutation qui inactive STAT3. Par conséquent, les lymphocytes B naïfs de ces patients ne parviennent pas à se différencier en plasmocytes sécréteurs d'Ac suivant la stimulation à l'IL-21, ce qui perturbe leur capacité à monter une réponse immunitaire humorale (Avery *et al.*, 2010).

1.5.2 La famille des SOCS

La famille des « supressor of cytokine signalling » (SOCS) comprend huit membres : « Cytokine-inductible SH2-containing protein » (CIS), SOCS1-SOCS7. Elle permet d'atténuer les réponses cellulaires suivant leur activation par des cytokines par un effet d'une boucle de rétroaction négative. Ainsi, plusieurs cytokines permettent la transcription de différents membres de cette famille. Elles sont des régulateurs majeurs de la voie Jak-STAT. Les SOCS agissent en tant qu'ubiquitine ligase dirigeant ainsi leur cible vers une dégradation protéique par le protéasome. De plus, elles peuvent directement inhiber les Jak en agissant à titre de pseudosubstrat, ce qui limite leur capacité à activer les STAT. Elles régulent donc efficacement la réponse immune (Yoshimura *et al.*, 2007). Dans différentes cellules, l'IL-21 régule l'expression de SOCS1, SOCS2 et SOCS3 (Gagnon *et al.*, 2007, Marijnissen *et al.*, 2014, Qin *et al.*, 2009, Rückert *et al.*, 2008, Strengell *et al.*, 2006). Ainsi, l'expression de ces SOCS en réponse à l'IL-21 et l'IL-15 joue un rôle dans la maturation des cellules dendritiques (Strengell *et al.*, 2006) et dans la réponse des lymphocytes T CD8+, respectivement (Gagnon *et al.*, 2007).

1.5.3 La voie des MAPK

La famille des « mitogen activated protein kinase » (MAPK) comprend 14 membres chez les mammifères et peut être subdivisée en trois groupes, celui des « extracellular signal-regulated protein kinases » (ERK), celui des p38 MAP kinase et celui des c-Jun NH₂-terminal kinases (JNK). Elles ont toute la particularité d'être activées par une double phosphorylation dans un motif composé Thr-Xaa-Tyr où Xaa représente Glu, Gly et Pro pour les ERK, p38 et JNK respectivement. Elles sont toutes activées par des MAPK kinase (MKK) qui elles le sont par des MKK kinase (MKKK). Chaque MAPK possède une ou plusieurs MKK et MKKK spécifiques. Par exemple la MAPK ERK est activée par les MKK1 et MKK2. La voie des MAPK est majoritairement activée par les protéines G de différentes familles telles que les Ras et les Rho. Les MAPK régulent différentes fonctions cellulaires comme la prolifération, la survie, la différenciation, la maturation et la production de cytokines par une très grande variété de cellules (Dong *et al.*, 2002, Pearson *et al.*, 2001).

En plus de la voie Jak-STAT, l'IL-21 active aussi la voie des MAPK en commençant par la protéine adaptatrice Shc qui initie la cascade des MAPK (figure 2) (Zeng *et al.*, 2007). Conséquemment, une activation de ERK 1/2, p38 et JNK ont été rapportées dans différents types cellulaires incluant les lymphocytes, les monocytes et les cellules épithéliales de l'intestin suivant leur stimulation à l'IL-21 (Brenne *et al.*, 2002, Caruso *et al.*, 2007b, Fuqua *et al.*, 2008, Pelletier *et al.*, 2004a). L'activation des MAPK par l'IL-21 a été liée à la prolifération cellulaire et à la sécrétion de cytokines (Fuqua *et al.*, 2008, Zeng *et al.*, 2007).

1.5.4 La voie de la PI3K/Akt

Les « phosphoinositide 3 kinase » (PI3K) sont des kinases permettant, entre autres, la transformation du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol-3-4,5-trisphosphate (PIP₃). Plusieurs isoformes sont exprimées chez les mammifères et elles sont regroupées en 3 classes. La formation de PIP₃ par les PI3K participe à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, dont la phagocytose, le trafic vésiculaire, l'autophagie et la sécrétion de cytokines. Les PI3K peuvent être activées de différentes façons dont par les récepteurs tyrosine

kinase (RTK), les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et les « Toll like-receptor » (TLR) (Okkenhaug, 2013, Vergadi *et al.*, 2017). La présence de PIP3 à la membrane permet le recrutement et l'activation de la protéine kinase B (PKB ou Akt). L'activation d'Akt est liée au métabolisme, la prolifération et la survie cellulaire lui conférant ainsi un rôle central dans le développement de différentes pathologies telles que le cancer et les maladies auto-immunes (Oak *et al.*, 2007, Okkenhaug, 2013). Dans les lymphocytes B, l'activation de la voie de la PI3K/Akt par l'IL-21 est liée à la prolifération et la régulation à la hausse de l'expression du CD86 à leur surface (Attridge *et al.*, 2014, Zeng *et al.*, 2007).

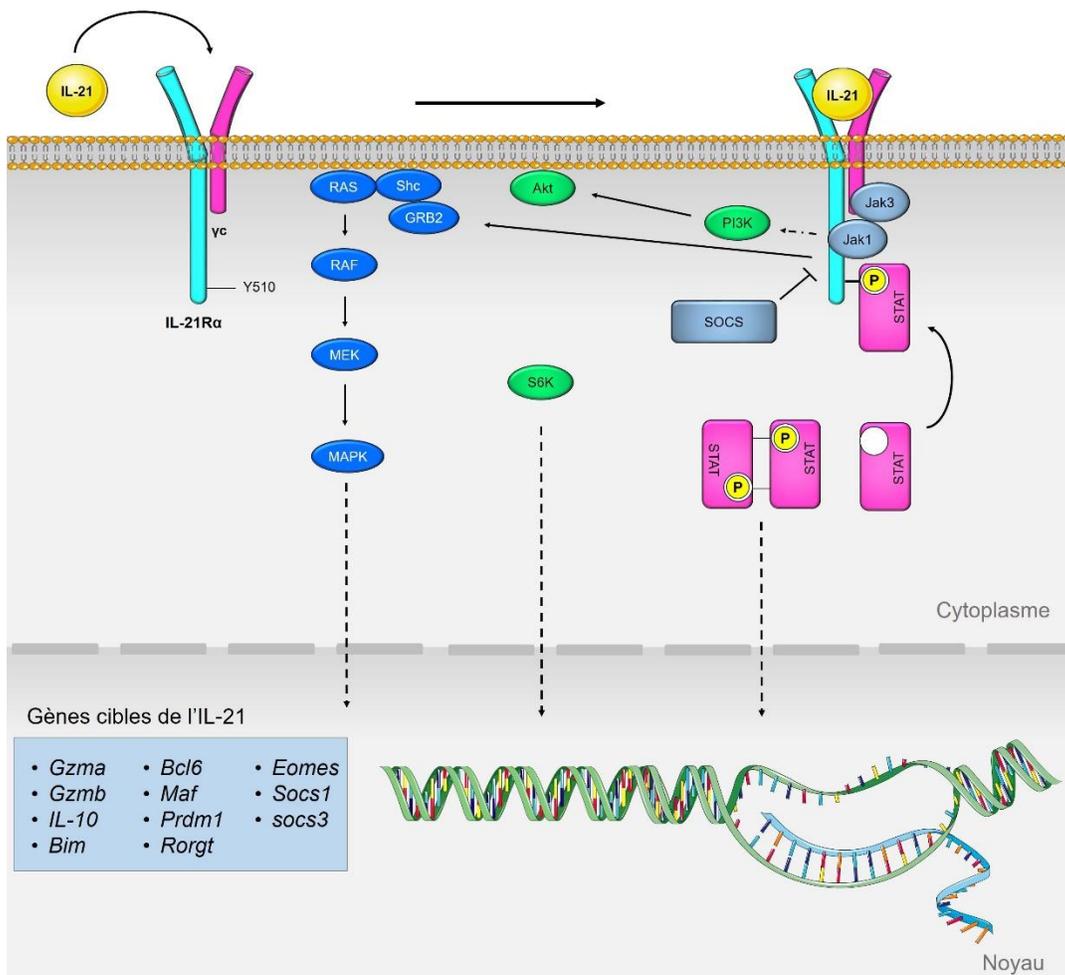


Figure 2 : Les principales voies de signalisation activées par l'IL-21. La liaison de l'IL-21 à son récepteur permet l'activation de Jak1 et Jak3, qui une fois activées vont permettre la phosphorylation de STAT1, STAT3 et STAT5. L'activation des STAT entraîne leur dimérisation et leur translocation vers le noyau. De plus, la voie des MAPK et celle de la PI3K sont également activées par l'IL-21. Chacune de ces voies régule la transcription des différents gènes cibles de l'IL-21.

Modifiée de (Spolski *et al.*, 2014).

Les voies de signalisation activées par l'IL-21 mènent à la régulation de nombreux gènes cibles dont la transcription de ceux codant pour le granzyme A (Gzma), le granzyme B (Gzmb), le B-lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp-1), le B-cell lymphoma 6 (Bcl-6), SOCS1, SOCS3, l'Eomesodermin (Eomes), l'Interferon- γ (IFN- γ), Jak3, l'IL-21 et l'IL-21R (figure 2) (Gagnon *et al.*, 2007, Kwon *et al.*, 2009, Ozaki *et al.*, 2004, Strengell *et al.*, 2004, Strengell *et al.*, 2003, Zeng *et al.*, 2007). Plusieurs de ces gènes répondant à l'IL-21 sont liés aux fonctions effectrices ou au programme de différenciation de divers types cellulaires, ce qui montre que l'IL-21 peut jouer des rôles variés dans plusieurs aspects de la biologie des cellules exprimant son récepteur. Ses effets sur les différents leucocytes seront abordés au chapitre 2.

1.6 Modification génétique de la signalisation à l'IL-21 chez la souris

1.6.1 Souris KO pour l'IL-21 et son récepteur

Les souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer l'IL-21R α (IL-21R $\alpha^{-/-}$) ou l'IL-21 (IL-21 $^{-/-}$) sont viables, fertiles et ne présentent aucune altération au niveau morphologique ou au niveau de la susceptibilité aux maladies en condition homéostatiques lorsqu'elles sont comparées aux souris sauvages (Fina *et al.*, 2008, Frohlich *et al.*, 2007, Kasaian *et al.*, 2002, Ozaki *et al.*, 2002, Shang *et al.*, 2006). Étant donné que le nombre de leurs cellules sanguines tels que les érythrocytes, les lymphocytes, les monocytes, les cellules NK et les granulocytes sont normaux, l'IL-21 ne semble pas jouer un rôle dans l'hématopoïèse (Frohlich *et al.*, 2007, Kasaian *et al.*, 2002, Ozaki *et al.*, 2002). De plus, aucunes différences significatives relativement aux phénotypes des populations lymphoïdes et myéloïdes retrouvées dans différents organes tels le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques n'est observée entre les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ et les souris sauvages. Les souris déficientes pour la signalisation à l'IL-21 présentent, malgré tout, des différences au niveau des immunoglobulines (Ig) retrouvées dans le sérum. Une surabondance d'IgE et un déficit des isotypes IgG₁ et IgG_{2b} est observée chez les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ et IL-21 $^{-/-}$ (Fina *et al.*, 2008, Frohlich *et al.*, 2007, Kasaian *et al.*, 2002, Ozaki *et al.*, 2002, Shang *et al.*, 2006). De surcroît, cette discordance au niveau des IgG et des IgE spécifiques à l'antigène dans le sérum est maintenue entre les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ et les souris sauvages suivant une immunisation à l'ovalbumine ou à la KLH (keyhole limpet haemocyanin) (Ozaki *et al.*, 2002, Shang *et al.*, 2006).

De plus, chez les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ la formation des centres germinaux est inadéquate en réponse à certaines infections virales (Bessa *et al.*, 2010). Malgré que les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ présentent des nombres normaux de lymphocytes CD8+ cytotoxiques (CTL) et CD8+ mémoires, leurs réponses antigène-spécifique primaire et secondaire sont grandement réduites par rapport au souris sauvages et ce, dans différents modèles d'infection virale (Barker *et al.*, 2010, Zeng *et al.*, 2005). La phase d'expansion défectueuse des lymphocytes mémoires explique, en partie, la réponse secondaire altérée et non pas une défaillance intrinsèque des fonctions des lymphocytes mémoires en soi puisque l'expression de leurs marqueurs de surface de même que leur sécrétion de cytokines sont intactes lorsque comparées à celles provenant des souris sauvages (Barker *et al.*, 2010).

1.6.2 Souris surexprimant l'IL-21

Les souris transgéniques surexprimant l'IL-21 murine montrent des retards de croissance sévères, possédant la moitié de la taille et du poids des souris sauvages, et meurent avant d'atteindre leur maturité sexuelle (Allard *et al.*, 2007, Ozaki *et al.*, 2004). Elles souffriraient d'une hématopoïèse altérée menant à une accumulation de cellules myéloïdes et une réduction marquée de l'érythropoïèse, ce qui provoquerait, ultimement, leur décès (Allard *et al.*, 2007). La surexpression élevée de l'IL-21 humaine chez les souris transgéniques entraîne la même fatalité que son homologue murin, alors qu'une surexpression à des niveaux plus modérés permet la survie des individus et ainsi l'étude de l'effet d'une surexpression de l'IL-21 (Ozaki *et al.*, 2004). Également, l'injection d'un plasmide codant pour l'IL-21 humaine directement dans la circulation sanguine, une technique nommée transfection hydrodynamique, permet la surexpression transitoire de l'IL-21 chez des souris adultes (Ozaki *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004). En utilisant ces deux derniers modèles, Ozaki *et al.* (2004) ont montré que la surexpression de IL-21 entraîne une augmentation de la taille de la rate, mais qui n'affecte pas la formation, ni des follicules, ni celle de la zone marginale de la rate. Elle y cause tout de même une accumulation de lymphocytes B immatures et de plasmocytes sécrétant des Ac de classe isotypique IgG. De plus, la rate de ces souris possède davantage de lymphocytes T (CD3⁺), principalement des lymphocytes CD8⁺, des cellules myélomonocytiques CD11b⁺ et un nombre réduit de cellules NK (Wang *et al.*, 2003). Dans une autre étude, une hausse des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (Sca-1⁺), majoritairement des cellules progénitrices CFU-GM, mais également les cellules souches KSL a

été observée dans la rate et la moelle osseuse (Ozaki *et al.*, 2006). Finalement, une augmentation marquée de la population lymphocytes CD8+ mémoires (CD44^{hi}, Ly6^{hi}, CD122^{hi}, CD62L^{lo}), une faible augmentation de la population de lymphocytes CD4+ mémoires (CD44^{hi}, CD45Rb^{lo}) sont également rapportées dans les organes lymphoïdes secondaires chez les souris surexprimant l'IL-21 murine avant qu'elles ne décèdent (de 3 à 6 semaines). Ainsi, la surexpression de l'IL-21 favoriserait l'accroissement de la population CD8+ mémoire au détriment de la population CD8+ naïve (Allard *et al.*, 2007).

Tableau 1 : Phénotypes des souris génétiquement modifiées pour la signalisation à l'IL-21.

Mutation	Phénotype	Références
Souris IL-21 Rα^{-/-}	Cycle de vie normal sans différences morphologiques Populations leucocytaires normales ↓ IgG ↑ IgE sériques Altération de la réponse spécifique Altération de la mémoire immunologique	Kasaian (2002) Ozaki (2002) Zeng (2005) Bessa (2010)
Souris IL-21^{-/-}	Cycle de vie normal Populations leucocytaires normales ↓ IgG ↑ IgE sériques Altération de la réponse spécifique	Shang (2006) Fina (2008)
Tg IL-21 murine	Retard de croissance majeur Décès avant maturité sexuelle Hématopoïèse altérée ↑ lymphocytes T mémoires avant le décès	Ozaki (2004, 2006) Wang (2003, 2004) Allard (2007)
Tg IL-21 humaine	Augmentation taille de la rate Accumulation de lymphocytes B à la rate ↑ IgG sériques Augmentation # cellules souches Sca-1+	Ozaki (2004, 2006) Wang (2004)

La génération de souris déficientes pour l'IL-21R α et en IL-21 a contribué à définir le rôle biologique de l'IL-21 et mettre en lumière l'implication de l'IL-21 le développement de plusieurs maladies. Un résumé des phénotypes observés chez les souris génétiquement modifiées est présenté au tableau 1. Les résultats de ces études seront abordés plus en profondeur au chapitre 2 dans les sections spécifiques portant sur l'effet direct de l'IL-21 sur les différents leucocytes et au chapitre 3 où l'implication de l'IL-21 dans différentes maladies inflammatoires est décrite plus en détail.

1.6.3 Perte de fonction de l'IL-21 et l'IL-21R chez l'humain

L'identification de mutation dans le gène de l'IL-21R et celui de l'IL-21 chez des patients souffrant du syndrome d'immunodéficience primaire a permis de mettre en évidence l'importance de la signalisation induite par l'IL-21 dans la formation d'un système immunitaire efficace (Erman *et al.*, 2015, Kotlarz *et al.*, 2013, Salzer *et al.*, 2014, Stepensky *et al.*, 2015). La majorité de ces patients souffraient de symptômes ressemblant à ceux des maladies inflammatoires de l'intestin (MII), notamment de la diarrhée chronique et d'une plus grande susceptibilité à diverses infections, par exemple *Pneumocystis jirovecii* et *Cryptosporidium spp.* (Erman *et al.*, 2015, Kotlarz *et al.*, 2013, Salzer *et al.*, 2014, Stepensky *et al.*, 2015). Cette plus grande susceptibilité aux infections est reflétée par la présence d'otite chronique, de nombreux épisodes d'abcès buccaux, de même que de fréquentes pneumonies. Différentes pathologies du foie telles que l'hépatomégalie, la cholangite et la cirrhose étaient également observées, mais uniquement chez les individus infectés par *Cryptosporidium spp.*, suggérant qu'elle découle davantage de l'infection que du déficit de signalisation par l'IL-21. Les désordres immunologiques observés chez ces individus comprennent notamment une réponse humorale altérée comme en témoigne une diminution du niveau d'IgG et d'IgA accompagnés par un niveau accru d'IgE circulant dans leur sang (Erman *et al.*, 2015, Kotlarz *et al.*, 2013, Salzer *et al.*, 2014, Stepensky *et al.*, 2015). Une diminution du nombre de lymphocytes B mémoires et de lymphocytes ayant effectué un changement de classe isotypique explique les anomalies du profil d'Ac retrouvé chez les individus malades. Également, plusieurs individus possédaient des taux réduits de lymphocytes T mémoires et de cellules NK ce qui diminuait grandement leur défense face aux pathogènes (Erman *et al.*, 2015, Kotlarz *et al.*, 2013, Stepensky *et al.*, 2015). Peu de patients ont survécu, le décès survenant tôt dans l'enfance suite aux complications des infections ou des traitements. De plus, plusieurs frères et sœurs de ces patients sont également décédés des suites de maladies ayant des symptômes similaires sans toutefois avoir subi un diagnostic génotypique permettant d'identifier la mutation dans le gène de l'IL-21 ou celui de l'IL-21R. Prenant en considération ces décès supplémentaires, le pronostic des personnes atteintes est très mauvais, avec un taux de mortalité avoisinant les 70 %. Les données recueillies auprès de ces patients permettent de mettre en lumière un rôle non redondant de l'IL-21 dans le développement du système immunitaire. Les principaux phénotypes associés à ces mutations répertoriées chez l'humain sont présentés au tableau 2.

Tableau 2 : Phénotypes d'une perte de fonction en signalisation à l'IL-21 chez l'humain.

Mutation	Phénotype	Références
IL-21R	Symptômes liés au MII ↑ susceptibilité aux infections Pathologie du foie ↓ IgG et IgA, ↑ IgE sériques Décès	Kotlarz (2013) Erman (2015) Stepensky (2015)
IL-21	Symptômes liés au MII ↑ susceptibilité aux infections ↓ IgG, ↑ IgE sériques	Salzer (2014)

CHAPITRE 2 : EFFET DE L'IL-21 SUR LES LEUCOCYTES

2.1 Cellules d'origine myéloïde

2.1.1 Monocytes

Les monocytes humains isolés du sang périphérique expriment la protéine et l'ARNm de l'IL-21R α à des niveaux variables (Pelletier *et al.*, 2004a, Strengell *et al.*, 2006). En réponse à l'IL-21, ils sécrètent de nombreuses cytokines telles que de l'IL-1,-2, -7, -8, -15, de l'IFN- γ , du TGF- β et de « Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted » (RANTES) (Fuqua *et al.*, 2008), quoique des résultats différents pour la sécrétion d'IL-8 sont rapportés (Pelletier *et al.*, 2004a). La différence au niveau de la sécrétion d'IL-8 obtenue pourrait être expliquée par les conditions expérimentales différentes entre les deux études. De plus, la lignée monocytique U937 répond de la manière similaire aux monocytes primaires à l'exception qu'une absence de sécrétion d'IFN- γ y est observée (Fuqua *et al.*, 2008). La stimulation des monocytes primaire et des U937 à l'IL-21 mène à la phosphorylation rapide de ERK 1/2. De plus, la sécrétion de cytokines se fait de manière dépendante de l'activation de ERK puisque l'utilisation d'un Ac anti-IL-21 et d'un inhibiteur de ERK renverse à la fois la phosphorylation de ERK et la production de cytokines observées en réponse à l'IL-21 (Fuqua *et al.*, 2008). Finalement, dans un modèle de rejet de greffe chez le rat, un accroissement du nombre de monocytes intravasculaires exprimant l'IL-21R α est retrouvé dans les vaisseaux sanguins du rein des allogreffes. Cela suggère un rôle potentiel de ces monocytes et de l'IL-21 dans le rejet du greffon (Hecker *et al.*, 2009). La littérature portant sur l'effet de l'IL-21 sur les monocytes demeure limitée. Toutefois, le peu d'études ayant investigué le rôle de l'IL-21 dans la biologie des monocytes révèle une avenue de recherche qui gagnerait à être davantage explorée.

2.1.2 Macrophages

Le rôle de l'IL-21 dans la biologie des macrophages a été étudié plus tardivement, puisque les premières études montraient que les tissus myéloïdes n'exprimaient pas l'IL-21R α . Toutefois, au fil du temps, de plus en plus d'études ont montré que l'IL-21 pourrait être en mesure de moduler

différentes fonctions des macrophages (Jungel *et al.*, 2004, Park-Min *et al.*, 2005, Pelletier *et al.*, 2004a, Pesce *et al.*, 2006, Rückert *et al.*, 2008). Ainsi, l'expression de la protéine et de l'ARNm de l'IL-21R α a été rapportée dans les MDMH, les macrophages synoviaux de patients atteints d'AR de même que dans les macrophages murins de différentes origines (Jungel *et al.*, 2004, Park-Min *et al.*, 2005, Pelletier *et al.*, 2004a, Pesce *et al.*, 2006, Rückert *et al.*, 2008). Dans le modèle murin de la poche d'air, l'IL-21 augmente le recrutement des leucocytes totaux et plus particulièrement celui des macrophages (Pelletier *et al.*, 2004a). L'IL-21 ne modifie ni la morphologie des macrophages telle que leur taille et leur granulosité, ni l'expression du marqueur de maturation F4/80 (Rückert *et al.*, 2008, Williams *et al.*, 2010). Elle peut tout de même agir comme facteur de survie en augmentant l'expression de p21^{waf1} et de p27^{kip1}, deux inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (Rückert *et al.*, 2008). De plus, l'IL-21 renverse l'apoptose induite par le LPS (Li *et al.*, 2013). Également, l'IL-21 accroît à la fois la capacité des macrophages à effectuer l'endocytose et leurs activités protéolytiques (Rückert *et al.*, 2008) suggérant que l'IL-21 pourrait favoriser l'élimination de certains pathogènes. De plus, elle augmente leur capacité de présentation antigénique permettant ainsi de stimuler la prolifération des lymphocytes T CD4+. Une augmentation de l'expression de CD80 et CD86 pourrait jouer un rôle dans cette modulation. Finalement, la sécrétion d'IL-8 et l'expression de l'ARNm de la métalloprotéase de la matrice (MMP) -12 des macrophages est stimulée en réponse à l'IL-21 (Pelletier *et al.*, 2004a) et (Rückert *et al.*, 2008).

Peu d'informations sont disponibles concernant les voies de signalisation activées par l'IL-21 dans les macrophages. Elle permet l'activation de ERK 1/2, la translocation du facteur nucléaire κ B (NF κ B) au noyau et augmente l'expression de SOCS-2 et SOCS-3 (Li *et al.*, 2013, Rückert *et al.*, 2008). Toutefois, lorsque les macrophages sont traités à la fois par le LPS et l'IL-21, l'IL-21 réduit la signalisation induite par le LPS en renversant l'activation de ERK et celle de NF κ B. L'ensemble de ces résultats montre que l'IL-21 peut moduler de façon significative la biologie des macrophages.

L'IL-21 peut également moduler le niveau et le type d'activation des macrophages. En effet, la stimulation à l'IL-21 des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (MDMO) ou celle des macrophages alvéolaires (AM) murins favorise l'activation alternative des macrophages tels qu'en témoigne la transcription accrue de différents marqueurs tels que l'arginase 1 (Arg1), « found in imflammatory zone » (FIZZ1) et « C-C motif ligand 12 (CCL12). De plus, une augmentation de

l'activité arginase totale est également observée en réponse à l'IL-21 (Hashimoto-Kataoka *et al.*, 2015, Pesce *et al.*, 2006, Rückert *et al.*, 2008). En outre, l'IL-21 inhibe la sécrétion de TNF, d'IL-6 et d'IL-1 β induite par le LPS, un puissant agent menant à l'activation classique des macrophages. (Li *et al.*, 2013). L'IL-21 accroît également l'expression de l'IL-4R α et celle de l'IL-13R α_1 à leur surface, ce qui amplifie la réponse des macrophages à ces deux cytokines connues pour favoriser leur activation alternative. Ainsi, le prétraitement à l'IL-21 des macrophages potentialise la réponse à l'IL-4 et l'IL-13 ce qui se traduit par une nette augmentation de la transcription de Arg1, FIZZ1 et de l'activité arginase totale (Pesce *et al.*, 2006). Par conséquent, l'activation alternative des macrophages par l'IL-21 a des implications dans différentes pathologies telles que l'hypertension artérielle pulmonaire et la réponse face à différents pathogènes tels que *Schistosoma mansoni* (Hashimoto-Kataoka *et al.*, 2015, Pesce *et al.*, 2006). En somme, ces données montrent que l'IL-21 pourrait contribuer à l'activation alternative des macrophages par les cytokines de type Th2 (Pesce *et al.*, 2006).

D'un autre côté, l'IL-21 diminue l'expression de différents marqueurs de l'activation alternative des macrophages, tels que la CCL17, le TGF- β , le VEGF et la CCL2 dans les macrophages associés aux tumeurs (MAT) (Xu *et al.*, 2015). Des résultats similaires ont été obtenus dans les MDMO où une diminution de l'expression de l'IL-10 et VEGF ainsi que dans les macrophages péritonéaux où une diminution de l'expression de l'IL-10, CCL17, VEGF et TGF- β est observée. De plus, le prétraitement des macrophages à l'IL-21 potentialise la réponse au LPS en augmentant l'expression du TNF et de l'IL-6 qui sont tous deux considérés comme étant des marqueurs de l'activation classique des macrophages (Xu *et al.*, 2015). Finalement, la modulation des MAT par l'IL-21 permet de réduire significativement la taille des tumeurs dans un modèle de cancer du sein métastatique (Xu *et al.*, 2015). Ces résultats à première vue contradictoires montrent la très grande plasticité des macrophages et soulignent à quel point leur état d'activation est un processus complexe qui peut être finement régulé selon les besoins de la situation. De plus, ils sont en accord avec la nouvelle ligne de pensée où l'état d'activation des macrophages ne peut être réduit à une dichotomie entre activation classique et activation alternative, mais comporterait plutôt un plus large spectre de possibilité, pouvant regrouper des marqueurs de chacun des différents états (Mosser *et al.*, 2008). Cet aspect de la biologie des macrophages sera abordé plus en détail au chapitre 4.

2.1.3 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) forment une famille de cellules partageant des caractéristiques semblables qui peuplent les différents organes du corps. Elles y jouent un rôle de surveillance et sont en mesure de déceler autant les dommages aux tissus que la présence d'agents pathogènes. Les DC possèdent une capacité accrue à capturer, à phagocyter, à apprêter (processing) et à présenter autant les antigènes provenant de l'environnement (incluant ceux qui sont issus de pathogènes) que ceux provenant des cellules de l'hôte. De ce fait, les DC participent activement à l'immunité acquise en contribuant significativement à l'activation des lymphocytes T, principalement en migrant dans les organes lymphoïdes secondaires où elles y présenteront les antigènes qu'elles auront apprêtés. De plus, en présentant des antigènes du soi (issus des cellules de l'hôte), les DC contribuent à la tolérance immunologique (Merad *et al.*, 2013, Steinman, 1991). Il est pertinent de souligner que selon leur phénotype (notamment le type de marqueurs exprimés à leur surface) et leur localisation tissulaire, les DC seront nommées de manière différente et posséderont des rôles et fonctions spécifiques à chacun de ces sous-types. De plus, les DC peuvent être obtenues *in vitro* à partir de différents précurseurs étendant davantage le nombre de sous-types de DC pouvant être étudié. Par exemple, parmi les DC se retrouvent les cellules de Langerhans, les DC conventionnelles (cDC), les DC plasmacytoïdes (pDC), les DC dérivées de la moelle osseuse (BMDC) et les DC dérivées des monocytes (MO-DC) (Shortman *et al.*, 2002). De plus, la plupart de ces sous-types peuvent être retrouvés à l'état immature ou activé ce qui amplifie l'étendue de leurs fonctions et de leur réponse face à différents stimuli, telle que la stimulation à l'IL-21. Comme pour les autres cellules d'origine myéloïde, la littérature concernant l'effet de l'IL-21 sur les DC est également limitée quoique plus étoffée que pour les monocytes et les macrophages.

D'abord, l'IL-21 induit l'apoptose des cDC de manière dépendante de l'expression de l'IL-21R, de l'activation de STAT3 et de l'expression de « Bcl-2 Interacting Mediator of cell death » (BIM) (Wan *et al.*, 2013). Cette apoptose peut être renversée par la stimulation au GM-CSF et ceci de manière dépendante de l'activation de STAT5. Conséquemment, la stimulation *in vivo* des cellules NKT par l'injection d' α -GalCer, entraînant ainsi une élévation des niveaux d'IL-21 sériques, mène à une diminution du nombre de cDC issues de la rate (Wan *et al.*, 2013). Il semble que les mécanismes menant à l'apoptose des cDC *in vivo* soient similaires à ceux identifiés *in vitro* puisque l'utilisation de différentes souris KO a permis d'identifier un rôle capital de l'expression de

l'IL-21R et BIM dans la mort de ces cDC. Toutefois, l'IL-21 ne modifie pas la morphologie et n'induit pas l'apoptose des BMDC (Brandt *et al.*, 2003a), ni celle des pDC en réponse à l'activation par les TLRs (7 et 9) (Karrich *et al.*, 2013). Somme toute, la nécessité de bien réguler la survie des DC est montrée chez les souris ayant des DC apoptose-résistante qui développent davantage de maladies auto-immunes systémiques (Wan *et al.*, 2013). Ainsi, l'IL-21 pourrait contribuer au maintien d'un niveau optimal de cDC présent dans un organisme en régulant l'apoptose de ces dernières.

Les DC présentent les antigènes qu'elle rencontre aux autres cellules, principalement les lymphocytes T, ce qui engendre leur activation subséquente. Pour ce faire, l'expression de différentes molécules de présentation antigénique telles que le CMH de classe II et les molécules de costimulation CD80 et CD86 ou bien celles de certains récepteurs nécessaires à la migration des DC, par exemple CCR7, est augmenté une fois l'antigène capturé et apprêté. Les DC passent ainsi d'un état immature à un état mature (Alloatti *et al.*, 2016, McColl, 2002). La différenciation des DC en présence d'IL-21 ou la stimulation de DC différenciée à l'IL-21 les contraint à un phénotype immature comme en témoigne leur capacité d'endocytose accrue (Ansen *et al.*, 2008, Brandt *et al.*, 2003a), une faible expression de molécule du CMH de classe II et du récepteur CCR7 ainsi qu'une plus forte expression du récepteur CCR5 (Brandt *et al.*, 2003a). De plus, les BMDC différenciées en présence d'IL-21 conservent leur phénotype immature (faible expression de CD80, CD86 et CMH II) malgré une sensibilisation à l'antigène isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou une stimulation au LPS, un puissant agent activateur des DC (Brandt *et al.*, 2003a). De plus, la maturation des MO-DC suivant la stimulation au LPS est également inhibée dans les cellules prétraitées à l'IL-21 (Strengell *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que l'IL-21 bloque la maturation d'une grande variété de DC à un phénotype immature. Ainsi, les DC traitées à l'IL-21 peinent à remplir leur fonction de présentation antigénique et par conséquent à stimuler la prolifération dépendante de l'antigène adéquate des lymphocytes T et ce, autant *in vitro* qu'*in vivo* (Brandt *et al.*, 2003a, Brandt *et al.*, 2003b). Par exemple, dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact (HSC), le transfert adoptif de DC différenciées en présence d'IL-21 ne parvient pas à reproduire les symptômes associés à l'HSC retrouvés chez les souris témoins, tel qu'une enflure au niveau de l'oreille, ce qui supporte la perte de capacité de ces DC à initier une réponse des lymphocytes T (Brandt *et al.*, 2003a, Brandt *et al.*, 2003b). De plus, les MO-DC stimulées à l'IL-21 ont une capacité réduite à stimuler l'expansion des lymphocytes T suggérant une altération de la présentation antigénique, notamment la diminution de l'expression des

molécules de costimulation (CD80, CD83 et CD86) ce qui est compatible avec une inhibition de la maturation des DC par l'IL-21 (Ansen *et al.*, 2008).

D'un autre côté, dans un modèle murin de diabète, les DC issues de la rate et du pancréas des souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ expriment plus faiblement le CMH de type II et le CD86 que les souris sauvages diminuant la présentation antigénique dans les ganglions lymphatiques associés à ces organes (Van Belle *et al.*, 2012). De plus, le transport de l'antigène ovalbumine-FITC (OVA-FITC) de l'organe aux ganglions lymphatiques est également diminué suggérant que l'IL-21R est nécessaire non seulement pour la maturation des DC, mais également pour leur migration vers les ganglions lymphatiques où se déroule majoritairement la présentation antigénique aux lymphocytes T (Jin *et al.*, 2009, Van Belle *et al.*, 2012). La diminution de la présentation antigénique ne provient pas d'une capacité réduite à capturer l'antigène des DC IL-21R $\alpha^{-/-}$ puisque leur capacité d'endocytose n'est pas affectée. De plus la fréquence, la fraction et le nombre absolu des différents sous-types de DC présentes dans les différents organes sont modifiée chez les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$. Par exemple, davantage de DC myéloïdes et de DC CD8 α^+ étaient retrouvées dans la rate des souris IL-21R $\alpha^{-/-}$, tandis que les niveaux de pDC demeuraient les mêmes (Van Belle *et al.*, 2012), suggérant ainsi que l'expression du récepteur de l'IL-21 est nécessaire pour la bonne représentation des différents types de DC aux organes. Toutefois, dans la peau, la répartition des différents sous-types (pDC, mDC et cellules de Langerhans) n'est pas affectée chez les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ (Jin *et al.*, 2009). De plus, le prétraitement des DC à l'IL-21 avant le chargement « loading » de l'antigène α -GalCer procure une meilleure activation des cellules NKT comme montrée par un accroissement de la sécrétion d'IFN- γ par les splénocytes (Maeda *et al.*, 2007). De surcroît, lorsque ces mêmes DC sont injectées chez la souris ou que de l'IL-21 est injecté préalablement à l' α -GalCer, le niveau sérique d'IFN- γ augmente également suggérant un rôle de l'IL-21 dans l'interaction entre les DC et les cellules NKT *in vivo* (Maeda *et al.*, 2007). À la lumière de ces résultats, il semble que l'IL-21 soit un modulateur de la présentation antigénique et de la localisation des DC. Toutefois, plusieurs facteurs encore méconnus influencent l'effet de cette cytokine qui parfois semble délétère alors que d'autres fois elle semble favorable à la présentation antigénique. Ceci souligne la nécessité de continuer l'effort de recherche afin de mieux discerner les mécanismes impliqués dans la modulation des fonctions des DC par l'IL-21.

Le LPS est un facteur majeur de maturation et d'activation des DC. Ainsi, la sécrétion d'une grande variété de cytokines est observée suivant la stimulation de ces cellules au LPS. Toutefois,

le prétraitement, la stimulation ou la différenciation en présence d'IL-21 des DC modifie de façon significative leur profil de cytokines exprimées ou sécrétées en réponse au LPS. Ainsi, dans les BMDC, les MO-DC et les BMDC différenciées en présence d'IL-21, la stimulation à IL-21 inhibe la sécrétion de différentes cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-21, TNF, IL-6, CCL5, CXCL10, IL-12) en réponse au LPS ou au le ligand de CD40 (CD40L) (Brandt *et al.*, 2003a, Maeda *et al.*, 2007, Strengell *et al.*, 2006). Également, il semble que le rôle modulateur de l'IL-21 sur la maturation et l'activation des DC ait été conservé au cours de l'évolution, puisque que l'homologue aviaire de l'IL-21 inhibe non seulement la maturation (faible expression de CCR7 et DC-LAMP), mais également l'expression d'IL-12 α , l'IFN- γ , l'IL-1 β et l'IL-6 par les DC de poulet stimulées au LPS (Rothwell *et al.*, 2012). Malgré la modulation de la réponse au LPS par l'IL-21, il ne semble pas qu'elle soit causée par la répression de la signalisation du TLR4, puisque l'IL-21 ne module ni l'expression de l'ARNm du TLR4, ni celle de certains des gènes impliqués dans sa signalisation (Strengell *et al.*, 2006). Toutefois, une augmentation de l'ARNm de SOCS1 et SOCS3 pourrait être impliquée dans la réduction de la sécrétion des cytokines en réponse au LPS (Strengell *et al.*, 2006).

Cependant, une étude réalisée sur les cDC murine et humaine montre que l'IL-21 entraîne rapidement la transcription, la synthèse et la sécrétion d'IL-1 β bioactive et ce plus intensément que l'agoniste classique LPS. Cette sécrétion d'IL-1 β n'est pas dépendante de l'activation de NF κ B, de la voie classique de l'inflammasome NLRP3, de la Caspase 1 et de pycard, ni de la voie non canonique de Caspase 8, mais dépend plutôt de l'activation des sérines protéases (Wan *et al.*, 2015). Cette sécrétion d'IL-1 β joue un rôle dans la réponse immune pathologique vis-à-vis le virus de la pneumonie murine (Wan *et al.*, 2015). De plus, l'IL-21 ne module pas la sécrétion de cytokine des pDC en réponse à l'activation des TLRs (7 et 9) (Karrich *et al.*, 2013). Finalement, les DC issus de souris IL-21R KO sécrète moins de PGE₂ et d'IL-6 en réponse au peptidoglycan (TLR2), ce qui altérerait la génération de lymphocyte Th17 (Liu *et al.*, 2011). Encore une fois, la différence dans la réponse des DC à l'IL-21 semble varier en fonction de différents facteurs, particulièrement du sous-type étudié et du type d'agoniste utilisé en co-stimulation.

Outre les cytokines, les DC peuvent, sous certaines conditions, être des sécréteurs non négligeables de granzyme B, une molécule également sécrétée par les lymphocytes T CD8+ et les cellules NK lors des réponses à médiation cellulaire (Tel *et al.*, 2014). De plus, les des pDC synthétise et sécrète du granzyme B en réponse à l'IL-21 (Karrich *et al.*, 2013, Salvi *et al.*, 2017)

ce qui contribue de manière significative à accroître l'efficacité de la lyse cellulaire effectuée par les cellules NK (Salvi *et al.*, 2017). La sécrétion de granzyme B par les pDC et l'augmentation de l'activité NK subséquente pourraient contribuer aux lésions cutanées observées chez les patients atteints de lupus érythémateux cutané (Salvi *et al.*, 2017). Toutefois, celle-ci peut également inhiber la capacité des pDC à stimuler la prolifération des lymphocytes T (Karrich *et al.*, 2013). De plus, lorsque les pDC sont simultanément stimulées par l'IL-21 et des agonistes des TLR (7 et 9), la sécrétion d'IFN- α engendrée par ces derniers inhibe la sécrétion de granzyme B de manière autocrine (Salvi *et al.*, 2017).

2.1.4 Neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants du sang périphérique et migrent aux tissus cibles en cas de besoin où ils y exerceront leurs différentes fonctions afin d'éliminer l'agent déclencheur. De ce fait, ils contribuent activement à la création de foyers inflammatoires. Les données concernant l'effet de l'IL-21 sur les neutrophiles sont rares et contradictoires. En effet, dans une première étude, l'IL-21R n'a pas été détecté dans les neutrophiles humains et par conséquent aucune des fonctions cellulaires testées n'a été modulée suivant leur stimulation à l'IL-21. Ainsi, l'IL-21 ne modulait pas l'apoptose, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la phagocytose de globules rouges de mouton opsonisés, le chimiotactisme et la production d'IL-8 des neutrophiles. Par contre, l'IL-21 parvient tout de même à recruter davantage de neutrophiles *in vivo* dans le modèle murin de la poche d'air (Pelletier *et al.*, 2004a). D'un autre côté, une étude publiée plus récemment stipule que les neutrophiles non isolés (sang total) expriment l'IL-21R et que leur stimulation à l'IL-21 dans le sang total, entraîne l'expression du CD16, du CD11b et accroît la phagocytose de bactérie et la production de ROS (Takeda *et al.*, 2014). En comparant l'expression de l'IL-21R à travers les différentes étapes d'un isolement classique des neutrophiles (sédimentation au dextran des globules rouges, Ficoll, choc osmotique), les auteurs concluent que chacune des étapes réduit l'expression de l'IL-21R, ce qui expliquerait les différences observées entre les deux études (Takeda *et al.*, 2014). Quoique cette dernière étude tend à montrer l'expression de l'IL-21R à la surface des neutrophiles et que la stimulation du sang total (donc en présence de l'ensemble des cellules sanguines) à l'IL-21 active certaines fonctions du neutrophile, l'effet de l'IL-21 pourrait plutôt provenir de la sécrétion de médiateurs solubles issus d'autres types cellulaires, d'autant plus que les voies de signalisation

habituellement activées par l'IL-21, telles la voie Jak-STAT et celle des MAPK ne sont pas activées par l'IL-21 dans les neutrophiles. De plus, le niveau de phosphorylation des tyrosines totales des neutrophiles diminue suivant le traitement à l'IL-21 ce qui est difficilement compatible avec leur activation (Takeda *et al.*, 2014).

2.1.5 Mastocytes

Les mastocytes sont présents principalement dans les tissus conjonctifs et les muqueuses. Ils se distinguent par la présence de nombreux granules sécrétoires de type lysosome. De par leur localisation, les mastocytes participent activement à la défense contre les pathogènes. Leurs granules comprennent de nombreuses molécules, incluant plusieurs protéases, de l'histamine et diverses cytokines. L'activation des mastocytes est notamment impliquée dans les réactions allergiques et dans les chocs anaphylactiques lors des cas plus sévères (Wernersson *et al.*, 2014). Peu d'études ont évalué l'effet de l'IL-21 sur les mastocytes. L'administration, *in vivo*, d'IL-21 diminue la dégranulation des mastocytes retrouvés dans les lésions épidermales causées par une réaction d'hypersensibilité de contact (Tamagawa-Mineoka *et al.*, 2011). Toutefois, comme aucune donnée portant sur l'effet direct d'une stimulation des mastocytes à l'IL-21 n'est disponible à ma connaissance, il est difficile de discerner si la diminution de la dégranulation observée provient d'un effet direct ou indirect de l'IL-21. D'autres études seront nécessaires afin de répondre à cette question.

2.1.6 Mégacaryocyte

Les mégacaryocytes sont responsables de la production des plaquettes sanguines (Muller-Newen *et al.*, 2017). Au cours du développement des mégacaryocytes à partir de précurseurs CD34+, l'expression de l'IL-21R α est régulée à la hausse, atteignant son maximum d'expression par les mégacaryocytes mature (Benbarche *et al.*, 2017). De plus, l'IL-21 stimule la prolifération des cellules progénitrices des mégacaryocytes par un mécanisme dépendant de l'activation de Jak3/STAT3, et ce autant *in vitro* qu'*in vivo*, ce qui s'accompagne par un nombre plus élevé de mégacaryocytes matures dans la moelle osseuse des souris surexprimant l'IL-21. Quoique l'IL-21 n'ait pas d'effet sur le phénotype des plaquettes produit par les mégacaryocytes stimulés, les

souris qui surexpriment l'IL-21 possèdent moins de plaquettes circulant dans leur sang. Toutefois les plaquettes retrouvées chez ces souris ont des marqueurs de cellules jeunes. Comme davantage de macrophage et de plaquette se retrouve au foie et à la rate des souris surexprimant l'IL-21, il est possible que l'IL-21 supporte l'élimination des plaquettes plus âgées par les macrophages, diminuant ainsi leur nombre en circulation et expliquant qu'il n'y reste que les plaquettes plus récemment synthétisées (Benbarche *et al.*, 2017).

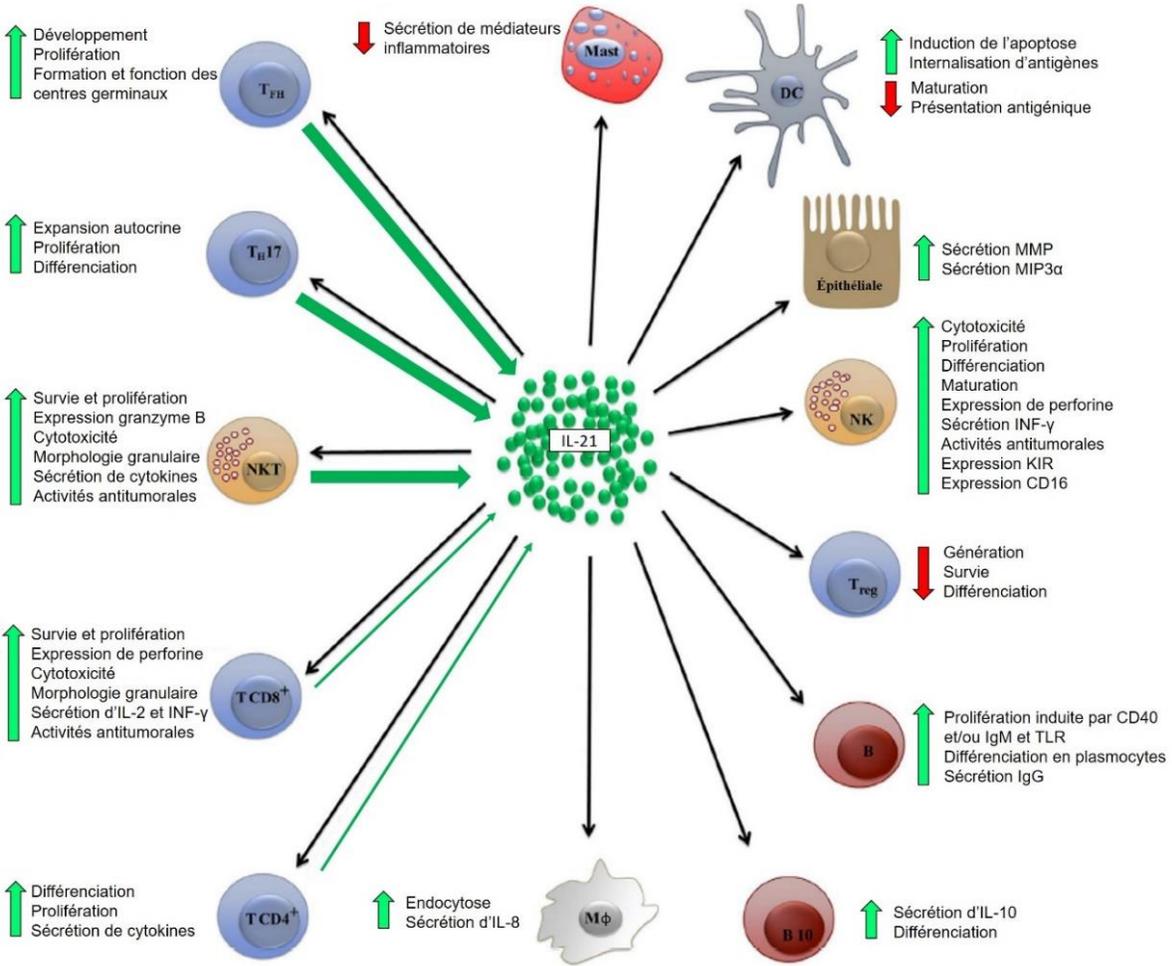


Figure 3 : Effets de l'IL-21 sur les fonctions des leucocytes. L'IL-21 est principalement sécrétée par les lymphocytes Th17, les T_{FH} et les cellules NKT. Elle exerce ses fonctions sur une multitude de cellules immunes. De façon générale, elle contribue à la survie, la prolifération et à l'activation des fonctions effectrices des leucocytes. Elle peut toutefois réguler à la baisse les fonctions des cellules dendritiques et des lymphocytes Treg.

Modifiée de (Gharibi *et al.*, 2016)

2.2 Cellules lymphoïdes

Les cellules d'origine lymphoïde comprennent les lymphocytes qui peuvent être séparés en différents sous-types dont les lymphocytes B (naïf, mémoire et plasmocyte), les lymphocytes T (les CD4+ ainsi que leurs différents sous-types tels que les T_{fh}, les T_{h17}, les T_{reg}, les CD8+ et les T_{mémoire}) et les cellules NK (Blom *et al.*, 2006, Caza *et al.*, 2015). Dans la présente section, les principaux effets de l'IL-21 sur ces différentes populations cellulaires seront brièvement discutés.

2.2.1 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont responsables de la réponse humorale. La reconnaissance d'un antigène, qu'il soit présenté ou non par une cellule présentatrice d'antigène, entraîne leur différenciation en cellules sécrétant des Ac : les cellules plasmiques ou plasmocytes. Ces cellules sont entre autres responsables de l'efficacité de la vaccination et d'une partie de la mémoire immunologique (Nutt *et al.*, 2015). Tel que discuté précédemment, l'utilisation de souris déficiente en signalisation pour l'IL-21 suggère fortement que l'IL-21 est un facteur déterminant de la biologie des lymphocytes B.

En effet, les études portant spécifiquement sur l'effet de l'IL-21 dans les lymphocytes B ont montré qu'elle régule leurs survies (Jin *et al.*, 2004, Mehta *et al.*, 2003, Ozaki *et al.*, 2004, Parrish-Novak *et al.*, 2000). Ainsi, d'un côté, elle favorise la prolifération des lymphocytes B matures stimulés par les récepteurs des cellules B (BCR) et par le CD40 et de l'autre, elle provoque l'apoptose des cellules B stimulées par les TLR (LPS et CpG) ou par les BCR en absence de signal T provenant du CD40 (Jin *et al.*, 2004, Mehta *et al.*, 2003, Ozaki *et al.*, 2004, Parrish-Novak *et al.*, 2000). L'apoptose initiée en réponse à l'IL-21 dépend de l'activation des caspases et de la surexpression de BIM (Jin *et al.*, 2004, Mehta *et al.*, 2003, Ozaki *et al.*, 2004).

L'IL-21 est également essentielle pour la production des Ac par les lymphocytes B. Ainsi, leur stimulation à l'IL-21 mène à leur différenciation en plasmocytes, et ce de manière dépendante de l'activation de STAT3, de la hausse de l'expression de Blimp-1 et de la réduction de celle de PAX5 (Avery *et al.*, 2010, Diehl *et al.*, 2008, Ettinger *et al.*, 2005, Ozaki *et al.*, 2004, Pene *et al.*, 2004).

L'IL-21 peut aussi réguler la classe isotypique des Ac produits en fonction du contexte. Par exemple, l'IL-21 favorise la production d'IgG, principalement des IgG1 et des IgG3. Elle potentialise aussi la réponse à l'IL-4 et à l'IL-2. Une production accrue de la protéine « activation-induced cytidine desaminase » (AID) en réponse à l'IL-21 est impliquée dans la sécrétion des IgG (Avery *et al.*, 2008, Berglund *et al.*, 2013, Ettinger *et al.*, 2005, Pene *et al.*, 2004). La stimulation à l'IL-21 favorise également la sécrétion IgA et IgM par les lymphocytes B et cette sécrétion peut être est inhibée par l'IL-4 (Avery *et al.*, 2008). Dépendamment du signal reçu, l'IL-21 peut également moduler la sécrétion d'IgE. Ainsi la stimulation à l'IL-21 en présence de PHA et d'IL-4 inhibe la sécrétion d'IgE alors qu'en présence IL-4 et de CD40L, elle favorise plutôt la sécrétion de cet isotype (Wood *et al.*, 2004). Donc, en fonction de l'intégration des signaux reçus simultanément, l'IL-21 influence l'isotype des Ac sécrétés par les plasmocytes.

Outre la sécrétion d'Ac, la stimulation à l'IL-21 entraîne également la sécrétion de granzyme B (Hagn *et al.*, 2009, Hagn *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2014) et d'IL-10 (Berglund *et al.*, 2013, Yoshizaki *et al.*, 2012) des lymphocytes B. De plus, elle accroît l'expression du CD86 de manière STAT3 et PI3k dépendante, ce qui permet d'améliorer leur capacité à stimuler les lymphocytes T (Attridge *et al.*, 2014). En somme, l'IL-21 régule la biologie des différentes populations de cellules B, notamment en favorisant la différenciation et la maturation des lymphocytes B en cellules plasmatisques, lui conférant du même coup un rôle capital dans l'initiation de la réponse humorale. L'induction de l'apoptose des cellules B pourrait également contribuer à éliminer de la circulation des lymphocytes B potentiellement autoréactifs (Jin *et al.*, 2004).

2.2.2 Lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes CD8+ (lymphocyte T cytotoxique ou CTL) jouent un rôle de premier plan dans la défense de l'hôte contre les infections virales et les tumeurs. Suivant la reconnaissance de l'antigène par le TCR dans un contexte de CMH, les lymphocytes T CD8+ naïfs acquerront différentes caractéristiques telles que la production de granzyme B, de perforine et du ligand de Fas (FasL) et la sécrétion de différentes cytokines comme l'IFN- γ et le TNF, leur permettant ainsi d'effectuer la lyse des cellules infectées ou tumorales (Halle *et al.*, 2017). Plusieurs études ont montré que la signalisation initiée par l'IL-21 influence la biologie des lymphocytes T CD8+.

D'abord, l'IL-21 favorise la survie des lymphocytes T (Ostiguy *et al.*, 2007, Zeng *et al.*, 2005) de manière dépendante de l'activation de la PI3K/AKT. L'activation de cette voie mène à une augmentation de la phosphorylation de BAD ce qui permet ultimement d'inhiber BAX et ainsi prolonger la survie des lymphocytes T (Ostiguy *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que l'IL-21 agit comme un costimulant pour favoriser la prolifération des lymphocytes T, et ceci en augmentant la réponse face à certains mitogènes connus de ces cellules. En effet, l'IL-21 utilisée seule n'a que peu d'effet sur la prolifération des lymphocytes CD8+ naïfs et mémoire. Toutefois, elle agit de façon synergique avec l'IL-15, l'IL-7 ou un Ac anti-CD3 (Alves *et al.*, 2005, Gagnon *et al.*, 2007, Parrish-Novak *et al.*, 2000, Zeng *et al.*, 2005) pour stimuler leur prolifération, et ce, de manière dépendante de l'activation des voies de la PI3K/AKT et ERK 1/2 (Zeng *et al.*, 2007). De plus, la réponse synergique entre l'IL-21 et l'IL-15 est contrôlée par SOCS1 puisque dans les T CD8+ déficients en SOCS1, l'effet synergique est augmenté (Gagnon *et al.*, 2007). Un prolongement de la signalisation initiée par l'IL-2, notamment la phosphorylation plus durable de STAT3, dans les lymphocytes SOCS1^{-/-} expliquerait cette différence.

Les études évaluant l'acquisition des propriétés cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ suivant la stimulation à l'IL-21 sont parfois contradictoires. D'une part, Hinrichs *et al.* (2008) ont montré que la stimulation à l'IL-21 de lymphocytes CD8+ naïfs activés par l'antigène réduit l'expression de granzyme B, de CD44 et de l'IL-2R α contrairement à ce qui est observé avec l'IL-2 et l'IL-15, deux agonistes puissants de la différenciation en CTL (Hinrichs *et al.*, 2008). La diminution de l'expression du facteur de transcription *Eomes* par l'IL-21 joue un rôle dans cet effet d'inhibition. Par conséquent, ces lymphocytes CD8+ stimulés à l'IL-21 sécrètent moins d'IFN- γ , davantage d'IL-2 et montrent une activité cytolytique réduite, témoignant d'une suppression de leur différenciation vers un phénotype cytotoxique. Toutefois, la stimulation à l'IL-21 de ces lymphocytes CD8+ leur confère néanmoins une plus grande capacité antitumorale (Hinrichs *et al.*, 2008). D'autre part, plusieurs études montrent plutôt que l'IL-21 augmente l'activation des CD8+ activés à l'Ag en présence d'un facteur de costimulation, par exemple l'IL-15, tel que montré par l'accroissement du nombre de cellules sécrétant de l'IFN- γ (Strengell *et al.*, 2003, Zeng *et al.*, 2005), du nombre de cellules spécifiques à l'Ag (Casey *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2008), l'expression de granzyme A (Sutherland *et al.*, 2013, Zeng *et al.*, 2005), de granzyme B (Casey *et al.*, 2007, Mittal *et al.*, 2012, Sutherland *et al.*, 2013, Zeng *et al.*, 2005), de perforine (Sutherland *et al.*, 2013) et de l'activité cytotoxique (Casey *et al.*, 2007, Sutherland *et al.*, 2013, Zeng *et al.*, 2005). L'activation de STAT3 par l'IL-21 et sa liaison au promoteur du gène de l'IFN- γ mène ainsi

à sa transcription et ultimement à sa sécrétion (Strengell *et al.*, 2003). L'IL-21 augmente aussi l'avidité des TCR et contribue au maintien d'un niveau d'expression élevé du CD28, ce qui permet, entre autres d'accroître la production d'IL-2 par les lymphocytes T CD8+ (Li *et al.*, 2005). L'expression accrue de granzyme B et de perforine par les lymphocytes T CD8+ dépend du facteur de transcription T-bet qui est stimulée par l'activation de STAT1 en réponse à l'IL-21 (Sutherland *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats renforce l'idée selon laquelle l'IL-21 soit un troisième signal, puisque pour accroître les fonctions effectrices des lymphocytes, elle nécessite à la fois une stimulation à l'Ag et un signal de costimulation (Casey *et al.*, 2007). Néanmoins, malgré les différences de l'effet de l'IL-21 sur les sous-types de lymphocytes T CD8+ *in vitro*, il n'en demeure pas moins que plusieurs études utilisant des modèles *in vivo* d'infection virale ou de cancer ont révélé le rôle capital de l'IL-21 afin de bâtir une réponse des CTL efficace, notamment face aux infections à LCMV (Chapuis *et al.*, 2016, Elsaesser *et al.*, 2009, Frohlich *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2003, Moroz *et al.*, 2004, Xin *et al.*, 2015, Yi *et al.*, 2009, Zeng *et al.*, 2005). Bref, comme en témoignent les résultats parfois contradictoires concernant l'effet de l'IL-21 sur les différentes populations de lymphocytes CD8+, le contexte dans lequel les cellules sont exposées à l'IL-21 déterminera le type de réponse cellulaire. Par conséquent, l'IL-21 pourrait être considérée comme une sorte de point de contrôle, par lequel la cellule obtiendra les informations nécessaires afin de déterminer le type de réponse à adopter.

2.2.3 Lymphocytes T CD4+

Suivant la reconnaissance d'un antigène et sous l'effet de différentes cytokines, les lymphocytes CD4+ naïfs se différencieront en différentes populations de lymphocytes qui moduleront la réponse immune en sécrétant un éventail de cytokine propre à chacun de ces sous-types. Ces lymphocytes sont nommés « helper ou Th » puisqu'ils servent à aider les autres types cellulaires à accomplir leurs fonctions effectrices. Des effets liés à la stimulation à l'IL-21 ont été rapportés chez la majorité des sous-populations de lymphocytes CD4+ tels que les T_{h1}, les T_{h2}, les T_{fh} et les T_{h17}.

Les résultats concernant l'effet de l'IL-21 sur les lymphocytes CD4+ sont, encore une fois, parfois contradictoires. En effet, certaines études rapportent que l'IL-21 soutient l'établissement d'une réponse de type T_{h2} en inhibant la sécrétion d'IFN- γ par les CD4+ naïfs. Elle agit en réprimant

l'expression de Eomes (Suto *et al.*, 2006, Wurster *et al.*, 2002) et en inhibant la signalisation initiée par l'IL-12 (Wurster *et al.*, 2002). De plus, dans un modèle d'infection avec *S. mansoni*, les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$, expriment des niveaux réduits de cytokines de type T_{h2} tel que l'IL-4 et l'IL-13 (Frohlich *et al.*, 2007, Pesce *et al.*, 2006). Dans un autre modèle générant une réponse T_{h2}, les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ présente également une diminution des marqueurs associés à ce type de réponse. Ces résultats soulignent l'importance de la signalisation en réponse à l'IL-21 dans la génération d'une réponse T_{h2} adéquate (Frohlich *et al.*, 2007). Toutefois, d'autres études montrent que l'IL-21 favoriserait plutôt une réponse Th1 en entraînant l'expression d'IFN- γ et d'IL-12, notamment par les lymphocytes issus de la lamina propria de patients atteints de la maladie de Crohn (MC) (Monteleone *et al.*, 2005, Strengell *et al.*, 2002).

Les lymphocytes T_{fh} sont, entre autres, caractérisés par l'expression de CXCR5, de ICOS et de PD-1 et tel que discuté précédemment sécrètent de grandes quantités d'IL-21. Ils se retrouvent principalement dans les follicules des nœuds lymphatiques où ils contribuent significativement à la formation de centre germinal fonctionnel, le lieu principal de la réponse humorale générée par les lymphocytes B (Tangye *et al.*, 2013). L'IL-21 en combinaison avec l'IL-6, mais en absence de TGF- β , est essentiel afin de générer des lymphocytes T_{fh}, et ce, de manière dépendante de l'activation de STAT3, de Vav1 et de la transcription de BCL-6 (Nurieva *et al.*, 2008, Nurieva *et al.*, 2009, Vogelzang *et al.*, 2008).

Les lymphocytes T_{h17} sécrètent de grandes quantités d'IL-17, d'où l'origine de leur appellation. Ils sont impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires, mais également dans le maintien de la barrière intestinale (Stockinger *et al.*, 2017). La différenciation *in vitro* en T_{h17} nécessite la stimulation séquentielle de TGF, d'IL-6 et d'IL-21 qui stimulent, entre autres, l'expression du récepteur nucléaire orphelin relié à l'acide rétinoïque (ROR γ T) qui est essentiel au développement des T_{h17}. L'IL-6 stimule la sécrétion d'IL-21 qui agit ensuite de manière autocrine en stabilisant l'engagement de la différenciation vers la lignée T_{h17} en augmentant l'expression de l'IL-23R (Korn *et al.*, 2007, Nurieva *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2007). Toutefois, malgré l'absence de signalisation à l'IL-21, une différenciation des T_{h17} est tout de même possible *in vivo* ce qui suggère une certaine redondance dans les éléments requis afin de générer les T_{h17} (Coquet *et al.*, 2008, Sonderegger *et al.*, 2008). Finalement, l'IL-21 inhibe la différenciation des lymphocytes T_{reg} ce qui pourrait contribuer à augmenter la réponse des lymphocytes CD8+ CTL (Attridge *et al.*, 2012, Schmitz *et al.*, 2013, Vogelzang *et al.*, 2008). En somme, les effets de l'IL-21 sur les

populations de lymphocytes T sont variés, complexes et parfois opposés et dépendent des autres signaux provenant de l'environnement dans lequel se retrouve la cellule.

2.2.4 Cellules NK

Les cellules NK, bien qu'elle soit d'origine lymphoïde, font partie du système immunitaire innée et jouent un rôle de premier plan dans la défense contre les pathogènes et les cellules tumorales. Elles produisent différentes cytokines telles que l'IFN- γ , le GM-CSF et le TNF qui peuvent à la fois moduler leurs fonctions cytotoxiques et activer le système immunitaire adaptatif (Moretta *et al.*, 2005). Les cytokines dépendantes de la chaîne γ c sont essentielles dans l'ontogenèse des cellules NK telles que montrées par une absence de ces cellules chez les souris KO pour la chaîne γ c (Cao *et al.*, 1995). Toutefois, la signalisation en réponse à l'IL-21 n'est pas essentielle au développement des cellules NK *in vivo* puisque les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ présentent un nombre normal de cellules NK fonctionnelles (Kasaian *et al.*, 2002, Ozaki *et al.*, 2002). Par contre, l'IL-21 stimule tout de même l'expansion et la maturation des cellules NK générées à partir de cellules progénitrices CD34+ humaines cultivées en présence du ligand de Flt3 (Flt3L) et d'IL-15 (Parrish-Novak *et al.*, 2000, Perez *et al.*, 2006). Elle favorise également l'expansion des cellules NK du sang périphérique stimulées à l'IL-2 (Burgess *et al.*, 2006, Wendt *et al.*, 2007). La stimulation à l'IL-21 des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34+ en présence d'une combinaison de facteur de différenciation (ex : IL-7, IL-15 et Flt3L) mène à la maturation des cellules NK tel qu'en témoigne l'expression accrue de marqueurs de maturation comme le CD2, le CD8, le CD16, Nkp30, 2B4 et les « killer Ig-like receptor (KIR) » (Brady *et al.*, 2004, Burgess *et al.*, 2006, Parrish-Novak *et al.*, 2000, Sivori *et al.*, 2003). La taille et la granulosité des cellules NK simulées avec de l'IL-21 sont également augmentées. Ainsi, le phénotype des cellules NK produites à partir de cellules progénitrices CD34+ différenciées en présence d'IL-21 en combinaison avec d'autres facteurs de différenciation ressemble davantage à celui des cellules NK matures circulant dans le sang. L'IL-21 augmente non seulement les fonctions cytolytiques, mais également la production et la sécrétion d'IFN- γ , de perforine et de GM-CSF (Kasaian *et al.*, 2002, Parrish-Novak *et al.*, 2000, Perez *et al.*, 2006, Sivori *et al.*, 2003, Strengell *et al.*, 2003, Toomey *et al.*, 2003) ce qui contribue à activer le système immunitaire adaptatif. Finalement, l'IL-21 peut affecter la viabilité des cellules NK, notamment en déclenchant leur apoptose (Brady *et al.*, 2004, Kasaian *et al.*, 2002, Toomey *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2003). En somme, l'effet de l'IL-21 sur la biologie des

cellules NK dépend du contexte et des costimulants présents. Ainsi, bien que l'IL-21 ne soit pas essentielle au développement de populations de cellules NK fonctionnelles *in vivo*, son addition dans les cultures de cellules NK contribue à leur maturation, leur différenciation finale et leur activation. L'IL-21 génère donc des cellules NK plus efficaces, mais avec une durée de vie plus courte, ce qui pourrait contribuer à limiter les dégâts potentiellement nocifs pour l'organisme occasionnés par une activation prolongée de ces cellules.

2.2.5 Cellules NKT

Les cellules NKT regroupent une population de cellules T exprimant des marqueurs de cellules NK en plus de TCR reconnaissant les antigènes lipidiques présentés par le CD1d. Elles jouent entre autres un rôle contre les infections bactériennes, parasitaires et virales, mais aussi contre certains cancers (Bendelac *et al.*, 2007). La stimulation conjointe avec de l'IL-21 et de l' α -GalCer accroît la survie, la prolifération et la granulosité des cellules NKT de même que la production de cytokines (IL-4 et IL-13), de perforine et de granzyme B (Coquet *et al.*, 2007). Comme observé pour d'autres types cellulaires, l'IL 21 agit également en synergie avec l'IL-15 ou l'IL-2 sur les cellules NKT. Elles produisent alors davantage de granzyme B et sont plus granulaires témoignant ainsi de leur plus grande activation. Tel que discuté précédemment, l'activation des NKT avec des Ac anti-CD3 et anti-28 et l' α -GalCer stimule la sécrétion d'IL-21 (Coquet *et al.*, 2007) qui peut par la suite non seulement agir de manière autocrine, mais également stimuler la réponse immunitaire adaptative.

Les données issues de la littérature montrent le rôle de l'IL-21 dans le développement du système immunitaire ainsi que dans la réponse immunitaire. Les effets de l'IL-21 sur les leucocytes sont résumés dans la figure 3.

Chapitre 3 : L'IL-21 ET LES MALADIES INFLAMMATOIRES

L'IL-21 est une cytokine pléiotropique régulant différents aspects du système immunitaire. Tel que décrit précédemment, elle affecte la biologie de la majorité des leucocytes ce qui permet d'expliquer qu'elle soit impliquée dans diverses pathologies inflammatoires ou auto-immunes lorsque son expression ou celle de son récepteur est modifiée. Il n'est donc pas étonnant que le système IL-21/IL-21R soit la cible de différentes stratégies thérapeutiques. À cet effet, le tableau 3 recense les études cliniques visant la signalisation de l'IL-21 comme cible thérapeutique. Dans la prochaine section, le rôle de l'IL-21 dans le développement de certaines maladies inflammatoires telles que l'AR, le lupus érythémateux systémique et les maladies inflammatoires de l'intestin sera brièvement abordé.

3.1 Arthrite rhumatoïde

L'AR est une maladie auto-immune chronique qui affecte de manière symétrique les articulations du corps. Elle est caractérisée par une inflammation de l'articulation synoviale et par la formation d'auto Ac qui cause, ultimement, la destruction du cartilage et l'érosion osseuse (Arnett *et al.*, 1988). Des évidences du rôle considérable que joue l'IL-21 dans l'AR sont venues de l'utilisation de modèles murins. Par exemple, les souris K/BxN développent spontanément une forme d'AR qui est, entre autres, causée par la présence d'auto-Ac (Ditzel, 2004). Toutefois, chez les souris K/BxN IL-21R $\alpha^{-/-}$ aucun signe du développement de la maladie n'est détectable alors que les souris K/BxN hétérozygote IL-21R $\alpha^{+/-}$ et sauvage montrent une augmentation de l'indice d'arthrite, de l'épaisseur des coussinets et des mesures histopathologiques associées au développement de l'AR. De plus, les souris IL-21R $\alpha^{-/-}$ ont un nombre réduit de lymphocytes T CD4+, de T_{fh} et ne développe pas d'auto-Ac soulignant le rôle de l'IL-21 dans le développement de ces cellules et dans la production d'Ac (Jang *et al.*, 2009). De surcroît, le blocage de la voie IL-21/IL-21R par une protéine de fusion composée du domaine extracellulaire de l'IL-21R α fusionné à la portion constante des Ig (IL-21R.Fc) améliore grandement la progression de la maladie d'arthrite chez les souris K/BxN, dans un modèle d'AR causée par un adjuvant chez le rat et dans le modèle plus classique d'induction de l'AR par le collagène chez la souris (Jang *et al.*, 2009, Young *et al.*, 2007). Finalement, une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-17 survient suite au blocage de l'IL-21 endogène (Young *et al.*, 2007). Ces deux cytokines en plus

d'autres cytokines pro-inflammatoires sont associées avec la pathogénicité de l'AR (Alam *et al.*, 2017). En somme, ces résultats suggèrent que la signalisation en réponse à l'IL-21 joue un rôle prépondérant dans le développement de cette maladie.

Chez l'humain, l'expression de l'IL-21R a été rapportée dans les macrophages synoviaux et les fibroblastes synoviaux de patients atteints d'AR, mais non chez ceux souffrant d'ostéoarthrite (Jungel *et al.*, 2004). De plus, les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK isolés du sang périphérique et du liquide synovial des patients atteints d'AR expriment davantage l'IL-21R, soutenant ainsi un rôle potentiel de l'IL-21 dans l'établissement et le maintien de la maladie (Li *et al.*, 2006). Des quantités plus élevées d'IL-21 et d'IL-17 issus vraisemblablement d'un nombre accru de T_{H17} sont également retrouvées dans le liquide synovial et le sérum de patient atteint d'AR (Niu *et al.*, 2010). Lorsque stimulées à l'IL-21, ces cellules répondent plus fortement en sécrétant de hauts niveaux de différentes cytokines connues pour être impliquées dans l'AR comme le TNF et l'IFN- γ (Li *et al.*, 2006). De plus, les lymphocytes CD4⁺ exprimant l'IL-21 isolés de patients atteints d'AR stimulent la sécrétion de MMP-1 par les synoviocytes contribuant ainsi à la dégradation de la matrice extracellulaire (Lebre *et al.*, 2017). En augmentant la sécrétion de « receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) », l'IL-21 promeut la différenciation des ostéoclastes favorisant ainsi l'érosion osseuse (Kwok *et al.*, 2012, Lebre *et al.*, 2017). Finalement, le blocage de l'IL-21 avec l'IL-21R.Fc dans les cultures de cellules synoviales de patients atteints d'AR permet de réduire de 50 %, 57 % et 86 % la production de TNF, d'IL-6 et d'IL-1 β , respectivement. Ces cytokines pro-inflammatoires sont toutes connues pour jouer un rôle dans le développement et la progression de la maladie (Alam *et al.*, 2017, Andersson *et al.*, 2008). Différents essais cliniques (NCT01208506, NCT01565408, NCT01647451 et EudraCT 2011-005376-42) ont été réalisés afin d'évaluer l'utilisation d'Ac neutralisant l'IL-21 afin de réduire voire éliminer les symptômes d'AR (tableau 3). Les résultats de deux d'entre elles sont disponibles et montrent une amélioration des signes cliniques suivant la neutralisation de l'IL-21 (Ignatenko *et al.*, 2016).

3.2 Lupus érythémateux systémique

Le lupus érythémateux systémique (SLE) est une maladie auto-immune systémique chronique caractérisée par la génération d'auto-Ac dirigés contre diverses molécules, principalement contre

l'ADN double-brins menant à la formation de complexes immuns. La présence de ces complexes immuns contribue à l'établissement d'une réponse inflammatoire systémique qui affectera, de manière imprévisible, différents organes. Des facteurs génétiques et environnementaux seraient également impliqués dans la manifestation clinique du SLE (Tsokos, 2011). Les observations initiales de l'effet de l'IL-21 sur la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes ont incité Ozaki *et al* (2004) à quantifier les niveaux d'IL-21 dans le modèle murin de SLE utilisant les souris BXSB-Yaa, qui développent spontanément le SLE en vieillissant. Ainsi, ils y ont observé des niveaux sériques plus élevés d'IL-21, d'IgG1 et d'IgG3 corrélant avec l'apparition des signes cliniques de la maladie (Ozaki *et al.*, 2004). Le développement de la maladie chez ces souris dépend principalement de la signalisation de l'IL-21 dans les lymphocytes B (McPhee *et al.*, 2013). De plus, les souris sanroque ayant une mutation dans le gène codant pour roquin, développent aussi spontanément des symptômes liés au SLE. Chez ces souris, la mutation ne permet plus la répression de l'expression d'ICOS, un facteur participant à la régulation de l'expression de l'IL-21. Ainsi, des niveaux plus élevés d'ARNm de l'IL-21 et une augmentation de lymphadénopathie, de glomérulonéphrite et la présence accrue d'auto-Ac sont retrouvés chez ces souris (Vinueza *et al.*, 2005). De plus, l'utilisation de la protéine de fusion IL-21R.FC chez les souris MRL^{lpr}, un autre modèle murin de SLE, ou l'utilisation de souris déficiente en signalisation par l'IL-21 réduit considérablement voire élimine les symptômes associés au SLE, soulignant encore davantage le rôle de l'IL-21 dans cette pathologie. Par exemple, une réduction de la protéinurie, de la lymphadénopathie, des niveaux d'auto-Ac et des dysfonctions rénales est observée chez ces souris traitées à l'IL-21R.FC, ce qui prolonge leurs survies (Bubier *et al.*, 2007, Bubier *et al.*, 2009, Herber *et al.*, 2007, Rankin *et al.*, 2012).

Chez l'humain, un polymorphisme de type SNP présent dans le gène de l'IL-21 et celui de son récepteur est associé à une plus grande fréquence de SLE (Sawalha *et al.*, 2008, Webb *et al.*, 2009). De plus, le nombre de lymphocytes T CD4+ sécrétant de l'IL-21 est augmenté chez les patients SLE (Terrier *et al.*, 2012), ce qui peut expliquer leurs niveaux plasmatiques élevés d'IL-21 (Wong *et al.*, 2010). Davantage d'IL-21 est également retrouvés dans les lésions cutanées des patients atteints de SLE (Caruso *et al.*, 2009). Les présentes données suggèrent donc que l'IL-21 contribue grandement à la pathologie clinique des patients atteints de SLE, principalement en activant les lymphocytes B, favorisant ainsi la sécrétion d'auto-Ac. L'IL-21 est donc une cible potentielle pour le traitement du SLE et une étude clinique a été réalisée afin de déterminer si le blocage de l'IL-21 avec un Ac neutralisant pouvait atténuer les symptômes de la maladie

(NCT01689025) (tableau 3). Malheureusement, les résultats de celle-ci ne sont toujours pas disponibles.

3.3 Les maladies inflammatoires de l'intestin

Les MII est un terme général regroupant principalement la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse. Elles sont caractérisées par une inflammation chronique de l'épithélium intestinal causée par une réponse immunitaire excessive envers la flore intestinale, mais également par une prédisposition génétique. Il en découle une infiltration leucocytaire majeure occasionnant une sécrétion élevée de cytokines inflammatoires et des dommages à l'épithélium et aux couches plus profondes de la muqueuse intestinale (Abraham *et al.*, 2009). Dans un modèle de colite ulcéreuse murine (DSS-TNBS), une surexpression de l'IL-21 corrélant avec l'apparition des symptômes est observée (Fina *et al.*, 2008). De plus, chez les souris IL-21^{-/-} et celles traitées avec l'IL-21R.FC l'apparition des signes cliniques est virtuellement totalement éliminée chez les premières et grandement améliorée chez les secondes, suggérant fortement un rôle de l'IL-21 dans la pathogénicité des MII (Fina *et al.*, 2008).

Chez l'humain, un polymorphisme au niveau du locus codant pour l'axe *IL2-IL21* est associé avec les MII de même que la maladie céliaque (Marquez *et al.*, 2009, van Heel *et al.*, 2007). De plus, l'IL-21 permet le recrutement des lymphocytes T_{H17} par la sécrétion de MIP-3 α par les cellules épithéliales du colon (Caruso *et al.*, 2007b). Ainsi, l'accroissement du nombre de lymphocytes T_{H17} et T_{H1} contribuent vraisemblablement à l'augmentation de l'expression de l'IL-21 retrouvée aux sites inflammatoires des patients MII (Monteleone *et al.*, 2005, Sarra *et al.*, 2010, Yamamoto-Furusho *et al.*, 2010). De plus, l'inhibition de la signalisation par l'IL-21 dans les cultures de cellules mononucléées de la lamina propria isolée de l'intestin de patients MC réduit leur sécrétion d'IFN- γ et d'IL-17A, deux cytokines contribuant au maintien de la maladie (Monteleone *et al.*, 2005, Rovedatti *et al.*, 2009). Finalement, l'IL-21 peut également contribuer à la destruction de la matrice extracellulaire et aux dommages infligés à la muqueuse intestinale en causant la sécrétion de plusieurs MMP par les fibroblastes intestinaux isolés de patient MC (Monteleone *et al.*, 2006, Sengupta *et al.*, 2007). Toutefois, comme mentionnés précédemment, les humains possédant des mutations inactivant la signalisation à l'IL-21 montrent également une prédisposition aux MII, suggérant que l'IL-21 joue également un rôle dans la prévention de

l'apparition de ces maladies (Kotlarz *et al.*, 2013, Salzer *et al.*, 2014, Stepensky *et al.*, 2015). Malgré que le rôle de l'IL-21 dans les MII ne soit pas encore complètement élucidé, il n'en demeure pas moins que la signalisation initiée en réponse à l'IL-21 est une composante de l'apparition de la maladie. Elle constitue donc une cible de choix dans le traitement de ces maladies. À ce sujet, une étude clinique visant le système IL-21/IL-21R (NCT01751152) a été réalisée, mais malheureusement les résultats ne sont toujours pas disponibles (tableau 3).

Tableau 3 : Essais cliniques ciblant la signalisation de l'IL-21

Traitement	Maladie	Phase	Statut	Résultat	Étude
Anti-IL-21	Carcinomes rénaux	-	Terminée	Non disponible	EudraCT 2006-005751-16
IL-21 + Sunitinib	Cellule de carcinomes rénaux	2	Complétée	Dose thérapeutique non tolérée (Grunwald <i>et al.</i> , 2011)	NCT00617253
IL-21 IL-21+ Sorafenib	Cellule de carcinomes rénaux	1	Complétée	ORR : 21% (Bhatia <i>et al.</i> , 2014)	NCT00389285
IL-21	Mélanome métastatique Cellule de carcinomes rénaux	1	Complétée	Mélanome métastatique : 1RC ; 11 SM; 24 totaux Carcinomes rénaux : 4 RP; 13 SM; 19 totaux (Thompson <i>et al.</i> , 2008)	NCT00095108
IL-21	Mélanome métastatique	1	Complétée	Biomarqueurs élevés (Davis <i>et al.</i> , 2007)	NN028-1614
IL-21	Mélanome	2	Complétée	ORR : 8.3% (Davis <i>et al.</i> , 2009)	NCT00336986
IL-21-CD8 + cyclophosphamide	Mélanome métastatique	1	Terminée	Non disponible	NCT01106235
IL-21	Mélanome	2	Terminée	Non disponible	NCT00601861
IL-21+ Ipilimumab	Mélanome	1	Complétée	Non disponible	NCT01489059
IL-21	Mélanome	2	Complétée	ORR : 22.5% (Petrella <i>et al.</i> , 2012)	NCT00514085
IL-21+ Dacarbazine	Mélanome	2	Complétée	Non disponible	NCT01552788
IL-21-NK	Leucémie myéloïde aiguë	1 2	Recrutement ouvert	Non disponible	NCT01787474
IL-21-NK	Leucémie myéloïde aiguë	1 2	Recrutement non ouvert	Non disponible	NCT02809092
IL-21 + Rituximab	Lymphome non Hodgkin	1	Complétée	84 % de réduction de la taille (Timmerman <i>et al.</i> , 2012)	NCT00347971
IL-21 + Caelyx	Cancer ovarien	2	Complétée	Non disponible	NCT00523380
IL-21 + Anti-PD-1	Tumeur solide	1	Complétée	Non disponible	NCT01629758
Anti-IL-21	Arthrite rhumatoïde	1	Complétée	Amélioration des signes cliniques (Ignatenko <i>et al.</i> , 2016)	NCT01208506
Anti-IL-21	Arthrite rhumatoïde	1	Complétée	Non disponible	NCT01565408
Anti-IL-21	Arthrite rhumatoïde	2	Complétée	Non disponible	NCT01647451
Anti-IL-21	Arthrite rhumatoïde	-	Complétée	Amélioration des signes cliniques	EudraCT 2011-005376-42
Anti-IL-21	Lupus érythémateux systémique	1	Terminée	Non disponible	NCT01689025
Anti-IL-21	Maladie de Crohn	2	Complétée	Non disponible	NCT01751152
Anti-IL-21R	Volontaire en santé	1	Complétée	75% anti-(anti-IL-21R) (Hua <i>et al.</i> , 2014)	NCT01162889

RC : réponse complète ; MS : maladie stable ; RP : réponse partielle ; ORR : réponse globale

Modifié de (Spolski *et al.*, 2014)

CHAPITRE 4 : LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES

4.1 Les monocytes

Les monocytes proviennent de cellules souches pluripotentes issues de la moelle osseuse. Elles sont les cellules les plus volumineuses circulant dans le sang où elles y représentent environ 10 % des leucocytes. Ils sont reconnaissables par la morphologie caractéristique de leur noyau en forme de rein/fer à cheval. Les monocytes humains peuvent être séparés en trois populations distinctes sur la base de l'expression de différents marqueurs de surface, les principaux étant le CD14 et le CD16 (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). Il est nécessaire de mentionner que les sous-types qui seront décrits prochainement sont également retrouvés chez différentes espèces. Bien que les marqueurs permettant de les distinguer diffèrent, l'analyse de leurs profils d'expressions géniques de même que leurs rôles biologiques sont similaires, particulièrement chez la souris (Ingersoll *et al.*, 2010, Ziegler-Heitbrock, 2014). Ainsi, la vaste majorité des monocytes humains ($\approx 90\%$) expriment fortement le CD14, le CD64 (Fc γ I), le récepteur de chimiokine CCR2, mais n'expriment pas le CD16 (Fc γ III). Cette population de monocytes dite classique est responsable de la colonisation des tissus principalement en conditions inflammatoires et non en condition homéostatique telle qu'initialement décrite (Hashimoto *et al.*, 2013, van Furth *et al.*, 1968). Une population de monocytes appelée intermédiaire exprimant fortement le CD14 et plus faiblement le CD16 est principalement impliquée dans la présentation antigénique et la réparation des tissus. Finalement, une dernière population dénommée non classique exprimant plus faiblement le CD14 et plus fortement le CD16 est responsable de la surveillance de l'intégrité de l'endothélium vasculaire et coordonne la réponse au stress vasculaire. Ces monocytes peuvent recruter les neutrophiles aux sections endommagées de l'endothélium vasculaire pour ensuite éliminer les débris cellulaires ainsi que les cellules apoptotiques. En ce sens, ils sont considérés comme les macrophages du sang. Il est proposé que les différentes sous populations soient le résultat d'une maturation des monocytes classiques vers les monocytes intermédiaires puis finalement vers les monocytes non classiques (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). Les marqueurs ainsi que les fonctions étant associés aux différents sous-types présents chez l'humain et chez la souris sont résumés au tableau 4. Les monocytes peuvent exercer une panoplie de fonctions biologiques telles que la phagocytose, la lyse cellulaire dépendante des Ac et la production de cytokines. Ainsi, ils peuvent contribuer de façon active à la défense de l'organisme à l'état de monocyte et non uniquement suivant leur différenciation en macrophages ou en DC (Serbina *et al.*, 2008). Les monocytes sont

également impliqués dans la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires telles que l'athérosclérose et l'AR (Bae *et al.*, 2012, Libby *et al.*, 2008).

Tableau 4 : Caractérisation et fonctions des différents sous-types de monocytes

Sous-population	Marqueurs	Récepteur de chimiokine	Fonctions
Souris			
LY6C++	CD11b+, CD115+, LY6C++	CCR2++, CX3CR1+	Pro-inflammatoire et antimicrobiens
LY6C+	CD11b+, CD115+, LY6C+	CCR2+, CX3CR1++	Patrouilleur, réponse précoce, réparation des tissus
Humain			
Classique	CD14++, CD16-	CCR2++, CX3CR1+	Pro-inflammatoire et antimicrobiens
Intermédiaire	CD14++, CD16+	CCR2+, CX3CR1++	Pro-inflammatoire
Non classique	CD14+, CD16++	CCR2+, CX3CR1++	Patrouilleur, antiviraux

Modifié de (Shi *et al.*, 2011)

4.2 Les macrophages

Les macrophages possèdent des rôles biologiques variés incluant le maintien de l'homéostasie des tissus, l'élimination des cellules apoptotiques, le remodelage et la réparation des tissus et la défense de l'organisme contre les infections (Erwig *et al.*, 2007, Mosser *et al.*, 2008, Murray *et al.*, 2011b). Ils se trouvent à l'intersection entre l'immunité innée et l'immunité acquise. Ils peuvent à la fois contribuer directement à l'élimination d'un pathogène et activer la réponse adaptative par leur capacité de présentation antigénique et leur sécrétion de cytokines. Plusieurs populations de macrophages spécialisés résident dans les différents tissus de l'organisme telles que les cellules de Kupffer (foie), les microglies (système nerveux), les ostéoclastes (os), les histiocytes (tissu connectif), les macrophages alvéolaires (poumons), etc. où ils peuvent y effectuer des fonctions

plus spécialisées (Pollard, 2009). La figure 4 présente le nom attribué à ces macrophages résidents des tissus et résume les principaux rôles biologiques qu'ils y accomplissent.

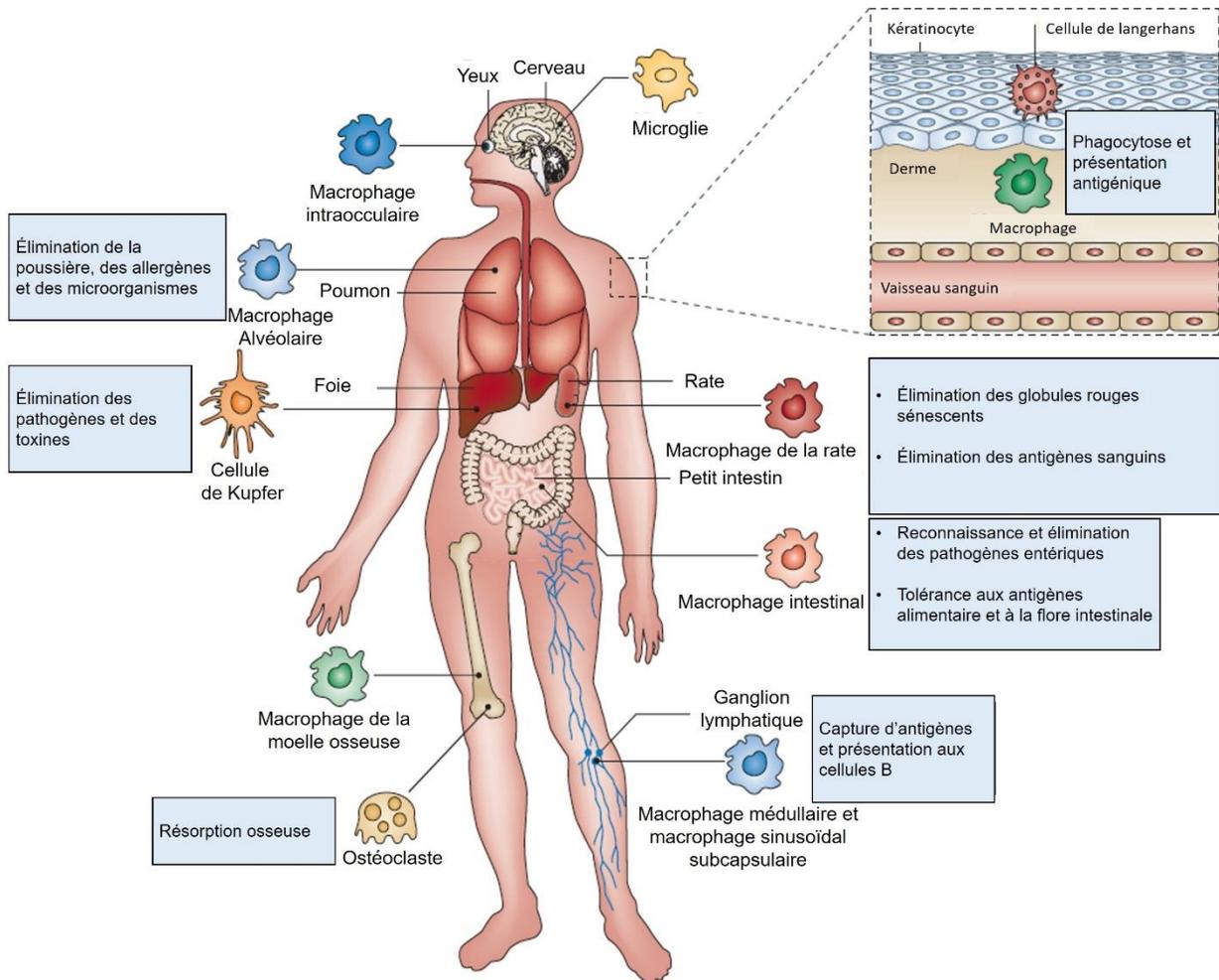


Figure 4. Dénomination et principaux rôles biologiques des macrophages résidents selon les tissus.

Plusieurs populations distinctes de macrophages peuplent l'ensemble des tissus de l'organisme où il y effectue différentes fonctions immunitaires, mais également des fonctions importantes dans le maintien de l'homéostasie. Pour ce faire, les macrophages disposent d'une variété de fonctions cellulaires telles que la phagocytose, la sécrétion de cytokines et la présentation antigénique.

Modifiée de (Murray *et al.*, 2011b)

Bien que les monocytes fussent initialement décrits comme étant le réservoir sanguin de cellules à partir desquelles les populations de macrophages et de cellules dendritiques résidentes des tissus se renouvellent, il est maintenant clair que la majorité des phagocytes résidents des tissus

ont une origine primitive, provenant du sac vitellin, ou une origine foétale se différenciant à partir de monocytes issus du foie. Ces différentes populations de macrophages se renouvellent par elles-mêmes en condition homéostatique, à l'exception de celles de l'intestin, du derme, du cœur et du pancréas où les monocytes générés dans la moelle osseuse et ensuite recrutés à ces tissus sont à l'origine des macrophages résidents (Ginhoux *et al.*, 2016). Les macrophages possèdent un large éventail de fonctions exécutrices leur permettant d'accomplir leurs rôles biologiques. Une de ces fonctions est d'effectuer la phagocytose à la fois de particules exogènes telles que les microorganismes, mais également endogènes telle que les cellules apoptotiques et les débris biologiques générés par l'organisme. De plus, les macrophages sécrètent une grande variété de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et de MMP dépendamment du contexte. Ainsi les macrophages sont non seulement essentiels dans la défense de l'hôte, mais également dans le développement et le maintien de l'homéostasie. La phagocytose, la production de cytokines et la sécrétion de MMP seront décrites plus en détail à la section 4.3.

Non seulement les macrophages spécialisés sont présents dans les différents tissus de l'organisme, mais ils peuvent en plus s'y retrouver à différents niveaux d'activation selon les signaux présents dans leur environnement. Traditionnellement, l'état d'activation des macrophages se classifiait d'une manière dichotomique entre activation classique et activation alternative où tous types d'activation ne correspondant pas à l'activation classique étaient automatiquement classifiés comme alternative. Toutefois, puisque cette classification ne reflète pas fidèlement l'entièreté des phénotypes des macrophages présents sous différentes conditions ni leurs fonctions spécifiques, cette nomenclature a été mainte fois remise en question (Gordon *et al.*, 2010, Hume, 2015, Mantovani *et al.*, 2004, Martinez *et al.*, 2014, Mosser *et al.*, 2008). Ainsi, la plus récente nomenclature de l'état d'activation des macrophages, basée sur leurs rôles biologiques distincts, proposée par Mosser *et al.* en 2008 est venue raffiner celle proposée par Mantovani *et al.* en 2004. Cette nouvelle classification regroupe trois principaux états d'activation/phénotypes : 1- les macrophages activés de manière classique 2- les macrophages réparateurs (Wound-healing) et 3- les macrophages régulateurs (Mosser *et al.*, 2008). Les réponses cellulaires de ces trois états d'activation sont distinctes.

D'abord, les macrophages activés de manière classique sont généralement produits suivant leur costimulation par les TLR et/ou par IFN- γ . Ils sécrètent de grandes quantités de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires et montrent une production accrue d'oxyde nitrique (NO). Ils

procurent une réponse efficace contre les infections bactériennes. De plus, ils possèdent des capacités de présentation antigénique accrues et favorisent une réponse T_{h1} (Benoit *et al.*, 2008). Ensuite, les macrophages réparateurs favorisent généralement la réparation et le retour à l'homéostasie des tissus par une expression accrue d'arginase cytosolique et la production de protéines reliées à la matrice extracellulaire. Ils sont produits suivant la stimulation par l'IL-4 et/ou l'IL-13, deux cytokines associées à une réponse T_{h2} . Ils sont incapables d'agir à titre de cellules présentatrices d'antigènes *in vitro*, produisent des niveaux négligeables de cytokines pro-inflammatoires et montrent une efficacité réduite d'élimination des pathogènes intracellulaires (Edwards *et al.*, 2006). Ce type de macrophage peut également être responsable d'effets délétères sur l'organisme lorsque leurs fonctions sont dérégulées. Par exemple, ils seraient impliqués dans la formation de certains types de fibroses due à une trop grande production de protéines de la matrice extracellulaire (Hesse *et al.*, 2001, Wynn *et al.*, 2010). Finalement, les macrophages régulateurs seraient obtenus par une combinaison de complexes immuns et d'agonistes des TLR ou par une combinaison de glucocorticoïdes et d'IL-10. D'autres facteurs tels que les prostaglandines, la phagocytose de cellules apoptotiques et certains ligands des récepteurs couplés aux protéines G peuvent également favoriser ce phénotype. Afin d'exprimer le phénotype de macrophages régulateurs, il semble essentiel pour ces cellules de recevoir deux stimuli. Ces macrophages sécrètent du TGF- β et de l'IL-10 et favorisent une réponse de type T_{h2} . Ils participent donc de manière significative afin de réduire l'intensité de la réponse immunitaire et inflammatoire. Contrairement aux macrophages réparateurs, les macrophages régulateurs ne contribuent pas à la formation de matrice extracellulaire (Mosser *et al.*, 2008). Les fonctions biologiques des macrophages sont donc variées et parfois opposées en favorisant à la fois la réponse inflammatoire et sa résolution ou encore en contribuant à la destruction d'un tissu et sa réparation (Gordon *et al.*, 2005). Un résumé des différents stimuli générant chacun de ces états d'activation est représenté à la figure 5.

Quoique cette classification des états d'activation soit plus efficace, elle ne reflète pas nécessairement la réalité retrouvée *in situ* où l'activation des macrophages se retrouve davantage à des niveaux intermédiaires entre les différents états mentionnés. Toutefois, elle permet une plus grande flexibilité puisque les différents états d'activation ne sont plus considérés comme un continuum. De plus, il est nécessaire de noter que l'état d'activation des macrophages n'est pas définitif et qu'il peut changer drastiquement si le microenvironnement dans lequel ils se retrouvent est modifié. Cette difficulté à classer les différents états d'activation des macrophages témoigne

de leur grande capacité à s'adapter en fonction des différents signaux provenant de son environnement, et de leur capacité à exercer un éventail complexe de fonctions biologiques (Mantovani *et al.*, 2004, Mosser *et al.*, 2008, Murray *et al.*, 2011a, Stout *et al.*, 2005). Ainsi, pour être à même d'explorer l'ensemble du spectre d'activation des macrophages une vision dynamique des différents processus, incluant leur plasticité, leur réversibilité et la mémoire de leur réponse doivent être pris en considération (Martinez *et al.*, 2014). D'ailleurs, devant l'absence de consensus dans la nomenclature caractérisant les différents états d'activation des macrophages, un collectif de chercheurs influents spécialisés dans la biologie des macrophages a proposé des lignes directrices concernant la terminologie et la marche à suivre afin de mieux définir à la fois le type de macrophages et les conditions expérimentales utilisées dans les études. Ceci dans le but de faciliter la comparaison entre les différentes études et ainsi mieux caractériser les différents phénotypes des macrophages (Murray *et al.*, 2014).

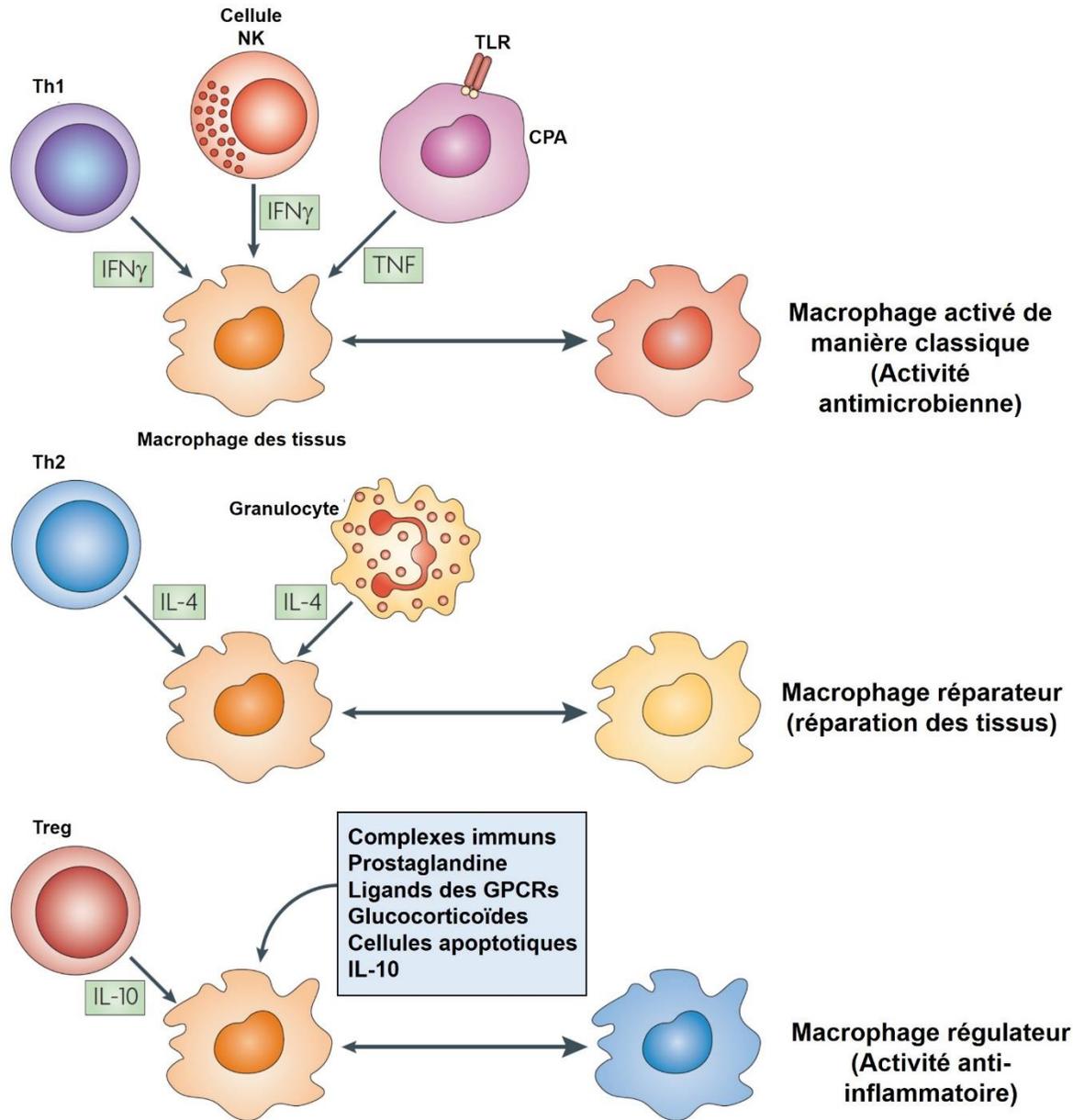


Figure 5. Diversité des fonctions biologiques des macrophages en réponse à différents stimuli. Les macrophages activés de manière classique sont générés suivant leur stimulation par l' $IFN\gamma$, le TNF ou le LPS. Ils sont pro-inflammatoires avec des capacités antimicrobiennes accrues. La signalisation initiée en réponse à l'IL-4 et/ou l'IL-13 favorise les macrophages réparateurs des tissus. Finalement, la combinaison de différents stimuli comme l'IL-10, les complexes immuns et les cellules apoptotiques permet la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages régulateurs.

Modifié de (Mosser *et al.*, 2008)

4.3 Les fonctions biologiques et cellulaires des monocytes et des macrophages

4.3.1 Les monocytes et les macrophages dans la réponse inflammatoire

L'inflammation est une réponse biologique normale, majoritairement bénéfique, qui a pour principal objectif le retour à l'homéostasie des tissus à la suite d'un trauma ou d'une infection (Medzhitov, 2008). Les macrophages résidents des tissus agissent principalement en tant que sentinelles permettant la détection rapide de menace pour l'homéostasie et orchestrent ainsi une série de réponses spécifiques associées aux dangers qu'ils détectent. Par exemple, lors d'une infection microbienne, les macrophages résidents des tissus vont reconnaître les agents pathogènes ce qui mènera à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires telles que de nombreuses cytokines. Ces agents pro-inflammatoires permettront, ultimement, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une infiltration leucocytaire (principalement des neutrophiles) au site de l'infection (Medzhitov, 2008). Les neutrophiles activés par l'agent infectieux et les cytokines présentes au site inflammatoire déploient alors un arsenal de molécules toxiques contenues dans leurs différents granules dont des ROS, des protéases et de l'élastase permettant ainsi de combattre efficacement l'infection (Kobayashi *et al.*, 2003). Toutefois, ces molécules toxiques ne disposent d'aucun pouvoir de discernement relativement à leurs cibles ce qui cause inévitablement des dommages aux tissus sains environnants (Nathan, 2002). La résolution de l'inflammation et la réparation des tissus suite à l'élimination de l'agent pathogène sont nécessaires à une réponse inflammatoire aiguë complète et efficace.

La résolution de l'inflammation passe par l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes professionnels dont font partie les monocytes et les macrophages. L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus bien orchestré permettant une élimination propre, c'est-à-dire en absence de libération du contenu cellulaire, de cellules devenues indésirables (Nagata, 2010). Lors de l'apoptose, il y a d'abord une condensation de la chromatine et du cytoplasme qui est accompagnée d'un bourgeonnement de la membrane plasmique. La cellule se fractionne alors en plusieurs vésicules nommées corps apoptotiques, qui contiennent des organelles intactes, du cytoplasme et des fractions du noyau (Nagata, 2010). Ce phénomène de bourgeonnement et de production de corps apoptotiques n'est toutefois pas aisément observé dans tous les types cellulaires, par exemple, dans le neutrophile. Finalement, le processus d'apoptose prend fin une fois que les cellules et les corps apoptotiques sont ingérés, entre autres,

par les macrophages, notamment en conditions inflammatoires. La phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages démarre le processus de résolution de l'inflammation. Ainsi, les macrophages sont non seulement impliqués dans la défense de l'organisme contre les envahisseurs pathogènes, mais ils sont également essentiels à l'arrêt de la réponse inflammatoire et au retour à l'homéostasie des tissus. Une inflammation chronique caractérisée par le remplacement des neutrophiles par un afflux de macrophages peut survenir dans l'éventualité où la résolution de l'inflammation est incomplète, que l'infection persiste ou qu'une réponse auto-immune se développe. Les mécanismes menant à une inflammation chronique systémique demeurent toutefois mal compris (Medzhitov, 2008). Les conséquences pathologiques résultant d'une réponse inflammatoire altérée en fonction du type de déclencheur initial sont représentées à la figure 6.

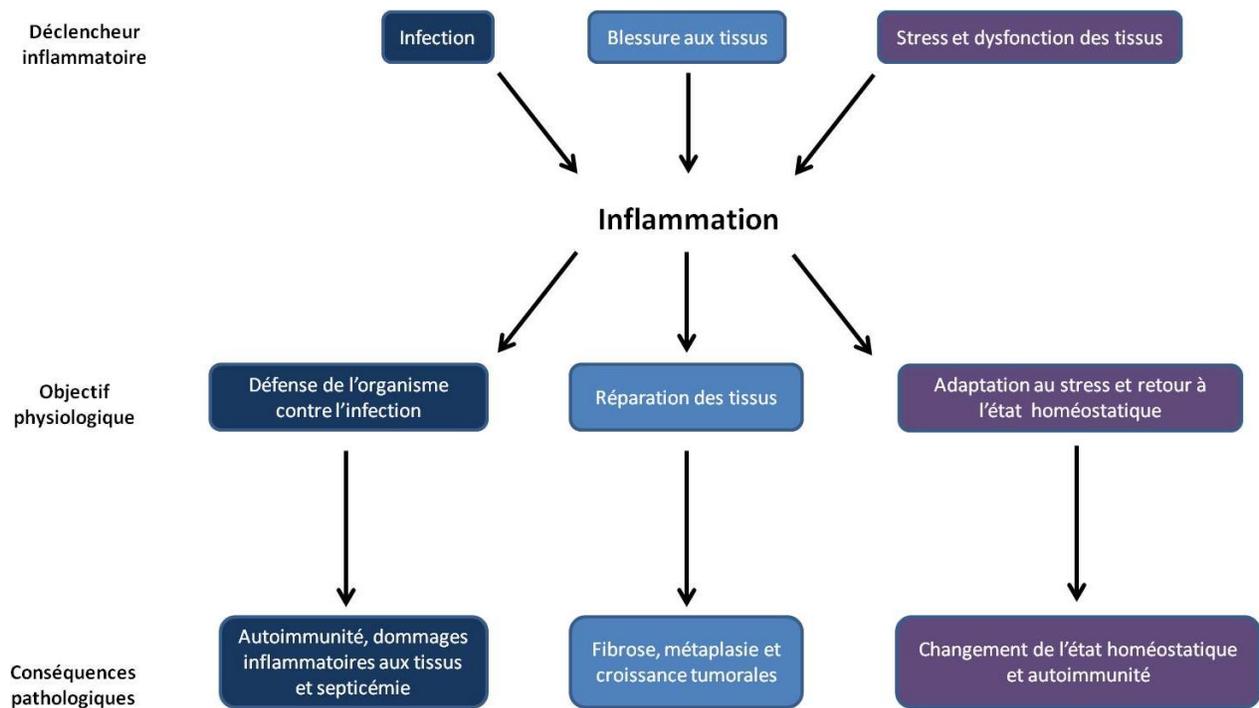


Figure 6. Les conséquences physiologiques et pathologiques en fonction de l'agent pro-inflammatoire. Le type de déclencheur inflammatoire initial démarrant la réponse inflammatoire influencera la réponse physiologique de même que le type de pathologie pouvant se développer.

Adaptée de Medzhitov (2008).

4.3.2 Le recrutement des monocytes

Le recrutement des monocytes au site inflammatoire et leur différenciation en macrophages ou en DC constituent un point tournant dans l'initiation de la réponse inflammatoire et les processus inflammatoires subséquents permettant le retour à l'homéostasie. Les mécanismes permettant leur recrutement sont très similaires à ceux des autres leucocytes en ce sens qu'ils comprennent sensiblement les mêmes étapes soit, le roulement, l'adhésion, le rampement (« crawling ») et finalement la transmigration tel que présentée dans la figure 7 (Gerhardt *et al.*, 2015). Ainsi, lorsqu'une infection ou un dommage survient dans un tissu, les cellules résidentes sécrètent de nombreux médiateurs permettant le recrutement des cellules nécessaires telles que les neutrophiles et les monocytes afin de contrer l'infection ou de favoriser la réparation de celui-ci. Ces facteurs agissent comme chimioattractant afin de guider les cellules requises au site inflammatoire. Parmi ces médiateurs, la sécrétion de MIP-1, de MIP-2, de MIP-3 et de RANTES compte parmi les plus importants dans le recrutement des monocytes (Baggiolini *et al.*, 1994). De plus, différentes cytokines telles que l'IL-1 β et le TNF activent les cellules endothéliales ce qui a pour effet d'accroître l'expression de différentes molécules d'adhésion telles que ICAM1 et VCAM1 à leur surface (Gerhardt *et al.*, 2015, Min *et al.*, 2005). La signalisation initiée en réponse aux chimiokines permet non seulement de guider les monocytes, mais également de modifier l'affinité des molécules d'adhésion pour leur ligand. Ce processus nommé signalisation « Inside-out » favorise un changement conformation des intégrines ce qui permet l'accessibilité au site de liaison (Carman *et al.*, 2003). L'interaction entre les monocytes et les cellules endothéliales se fait via plusieurs molécules d'adhésion qui sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5. Molécules impliquées dans le recrutement des monocytes

Nom commun	CD	Fonctions	Ligand
LFA-1	CD11a, CD18	Roulement, locomotion, arrêt	ICAM-1, -2
MAC-1	CD11b, CD18	Arrêt, locomotion, transmigraton, activation	Plusieurs
VLA-4	CD49d, CD29	Adhésion, transmigraton	VCAM-1
JAML		Arrêt, transmigraton	VLA-4
Récepteur du poliovirus	CD155	Transmigraton	TIGIT4
MIC2	CD99	Transmigraton	
CD99L2	CD99L2	Transmigraton	
L-Sélectine	CD62L	Roulement, signalisation	PSGL1, CD34
CCR1	CD191	Arrêt	CCL5
CCR5	CD195	Étalement, arrêt, transmigraton	CCL5
CCR2	CD192	Adhésion, transmigraton	CCL2, CCL7, CCL12
Eph A1, -2		Transmigraton	Ephrin-A ligand
Eph B1-4		Transmigraton	Ephrin-B ligand

Adapté de (Gerhardt *et al.*, 2015)

Essentiellement, l'expression de LFA-1, Mac-1, VLA-4, CD62L permet la liaison de différents ligands (ICAM1, -2, VCAM-1, PSGL-1, etc.) exprimés sur la surface luminale des cellules endothéliales ce qui favorise le roulement et l'adhésion ferme des monocytes aux sites inflammatoires (Gerhardt *et al.*, 2015, Imhof *et al.*, 2004). La signalisation initiée en réponse à l'adhésion ferme des monocytes sur les cellules endothéliales, principalement l'activation de protéines de la famille Src et Pyk-2, permet la dissociation entre la VE-Cadherin et l' α -caténine ce qui contribue à créer l'espace nécessaire entre les cellules endothéliales à la transmigraton des monocytes vers les tissus cibles. D'autres protéines telles que PECAM-1, le CD155, le CD99 de même que le CCR2 contribuent également au passage des monocytes à travers la paroi vasculaire (Gerhardt *et al.*, 2015, Imhof *et al.*, 2004). La sécrétion de MMP telles que MMP-2 et MMP-9 par les monocytes et les cellules résidentes facilite aussi leur passage en dégradant diverses composantes de la matrice extracellulaire. Une fois à destination, les monocytes peuvent directement exercer leurs fonctions exécutrices ou bien se différencier en macrophages et en DC selon les différents signaux présents au site inflammatoire.

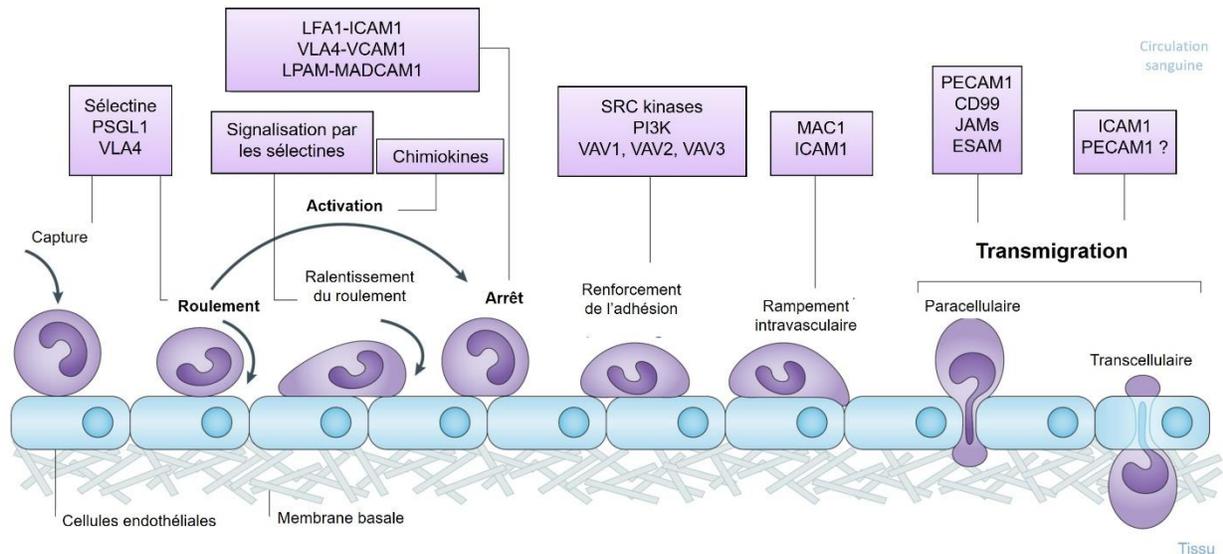


Figure 7. Étapes du recrutement des monocytes aux sites inflammatoires. L'activation des cellules endothéliales par des cytokines pro-inflammatoires mène à l'expression de molécules d'adhésion à leur surface. La liaison entre les sélectines lors de l'étape du roulement des monocytes active les intégrines et permet ainsi une adhésion plus ferme entre les monocytes et les cellules endothéliales. Par la suite, l'interaction entre différentes molécules et la sécrétion de MMP permet l'extravasation des monocytes vers le site inflammatoire. Modifiée de (Ley *et al.*, 2007)

4.3.3 La phagocytose

La phagocytose est une fonction cellulaire permettant l'internalisation par un mécanisme dépendant de l'actine et la dégradation d'une variété de particules d'origine biologique ou non d'une taille supérieure à 0,5 μm , telles que les microorganismes, les cellules sénescents et les débris environnementaux (Aderem *et al.*, 1999, Underhill *et al.*, 2012b). La phagocytose comporte une série d'évènements complexes permettant la reconnaissance, l'internalisation et la destruction de la particule ciblée. Ces différentes étapes sont présentées dans la figure 9. Les phagocytes professionnels regroupent plusieurs cellules spécialisées comprenant les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les granulocytes. Ils sont caractérisés, entre autres, par leur capacité accrue à exercer la phagocytose. Ces cellules hautement spécialisées possèdent un large éventail de récepteurs afin de bien identifier leurs cibles et ainsi permettre l'élimination efficace des particules indésirables. Dans certains cas, les particules devant être éliminées sont « marquées » par des molécules, nommées opsonines, telles que les Ac et

certaines composantes de protéines du complément ce qui facilite leur reconnaissance et leur internalisation. Par exemple, les monocytes et les macrophages possèdent des récepteurs tels que les récepteurs Fc (FcR) et les récepteurs du complément qui sont dédiés à la reconnaissance de ces opsonines (Aderem *et al.*, 1999, Ravetch *et al.*, 2001). Les cellules phagocytaires sont également responsables de l'élimination de particules non opsonisées et reconnaissent leurs cibles par d'autres récepteurs comme le récepteur Dectin 1 et le récepteur du mannose qui reconnaissent respectivement le β -glucan et l' α -mannan présent à la surface de différents microbes comme les organismes fongiques (Brown, 2006) ou le récepteur « macrophage receptor with collagenous structure » (MARCO) (Elomaa *et al.*, 1995) et le « scavenger receptor (SR) A » (Bowdish *et al.*, 2009) permettant, entre autres, la reconnaissance de certaines bactéries. De plus, les macrophages possèdent un nombre impressionnant de récepteurs permettant la distinction entre les cellules apoptotiques devant être éliminées et les cellules viables devant être épargnées. Parmi ces récepteurs, on retrouve le récepteur de la phosphatidylsérine (Fadok *et al.*, 2000, Fadok *et al.*, 2001, Hoffmann *et al.*, 2001), le CD36 (Greenberg *et al.*, 2006, Navazo *et al.*, 1996, Ren *et al.*, 1995), le CD14 (Devitt *et al.*, 1998, Devitt *et al.*, 2003, Schlegel *et al.*, 1999) permettent l'identification des cellules à être éliminées et le CD47 celles devant être épargnées (Lawrence *et al.*, 2009). Les récepteurs permettant la reconnaissance de ces différentes particules et leurs implications dans l'inflammation sont présentés à la figure 8.

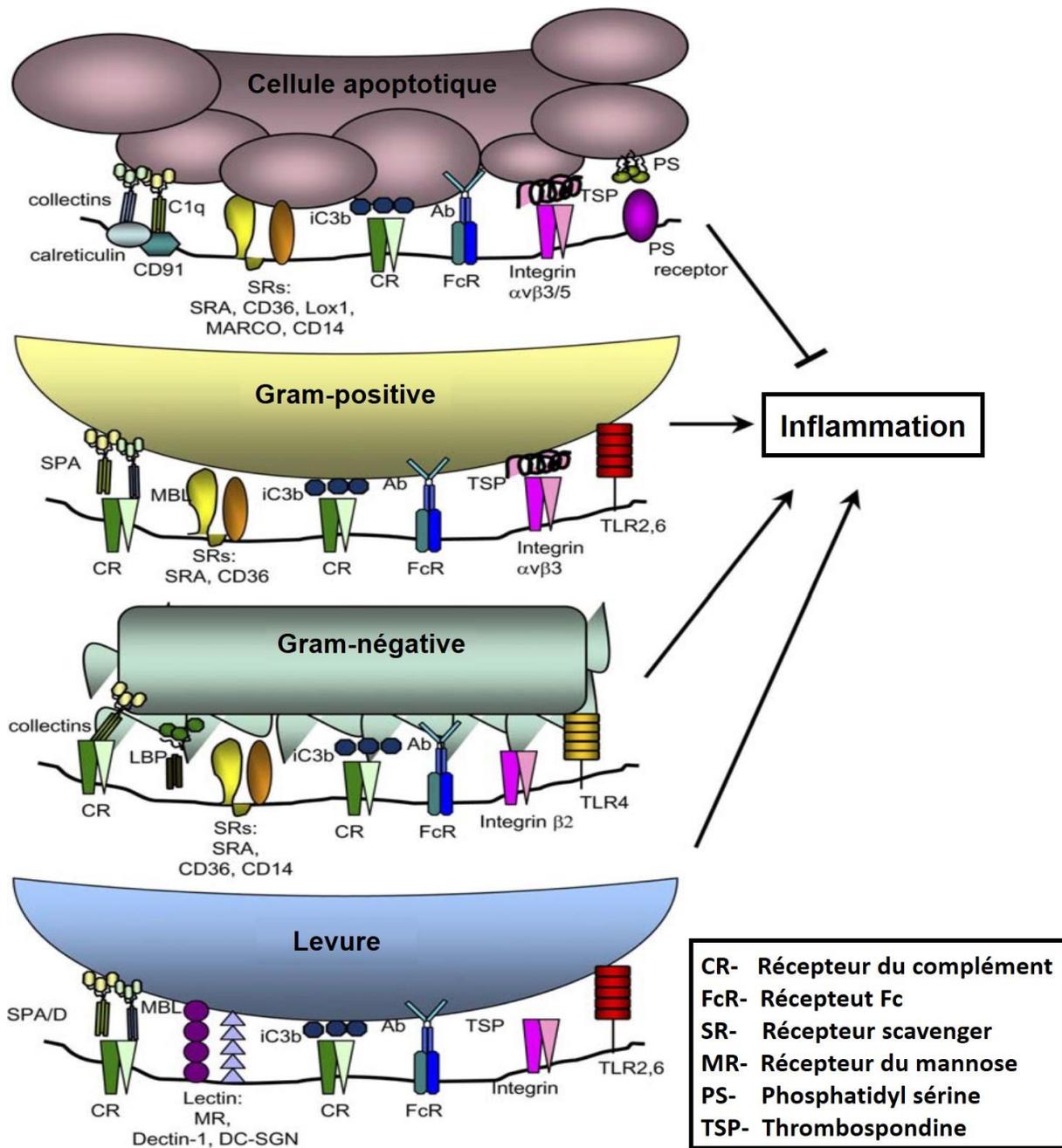


Figure 8. Principaux signaux de reconnaissance, les récepteurs impliqués et leurs implications dans la réponse inflammatoire. Différents récepteurs permettent la reconnaissance des particules devant être éliminées et dépendamment des récepteurs activés par la particule, la réponse physiologique diffère.

Modifiée de Stuart *et al.* (2005).

La phagocytose est initiée suivant la reconnaissance de la particule par les récepteurs ce qui mène à une mobilisation du cytosquelette d'actine au site d'interaction récepteur-particule et l'internalisation de ladite particule par un mécanisme dépendant de l'actine. Par la suite, l'internalisation de la particule forme une vacuole nommée phagosome. La formation du phagosome nécessite l'activation de nombreuses kinases (Syk, PI3K, etc.), un remodelage du cytosquelette et une accélération du trafic membranaire (Aderem *et al.*, 1999, Araki, 2006, Eng *et al.*, 2007, Harrison *et al.*, 2002, Kwiatkowska *et al.*, 1999). Ensuite, la maturation du phagosome vers le phagolysosome se fait de façon graduelle en recrutant, à chaque étape, une variété différente de protéines permettant, ultimement, l'acidification du compartiment phagosomal, le recrutement d'enzymes hydrolytiques, la synthèse de ROS et le recrutement et l'activation de différentes protéases (Hampton *et al.*, 1998, Vieira *et al.*, 2002). Suivant la formation du phagolysosome, une multitude d'éléments toxiques y sont retrouvés permettant ainsi la dégradation et l'élimination de la particule phagocytée. Dans les cellules présentatrices d'antigènes, les composés obtenus lors de l'étape de dégradation de la particule peuvent ainsi contribuer à l'activation de la réponse immunitaire adaptative suivant la présentation des antigènes obtenus dans le contexte de molécule de CHM de classe II (Underhill *et al.*, 2012b).

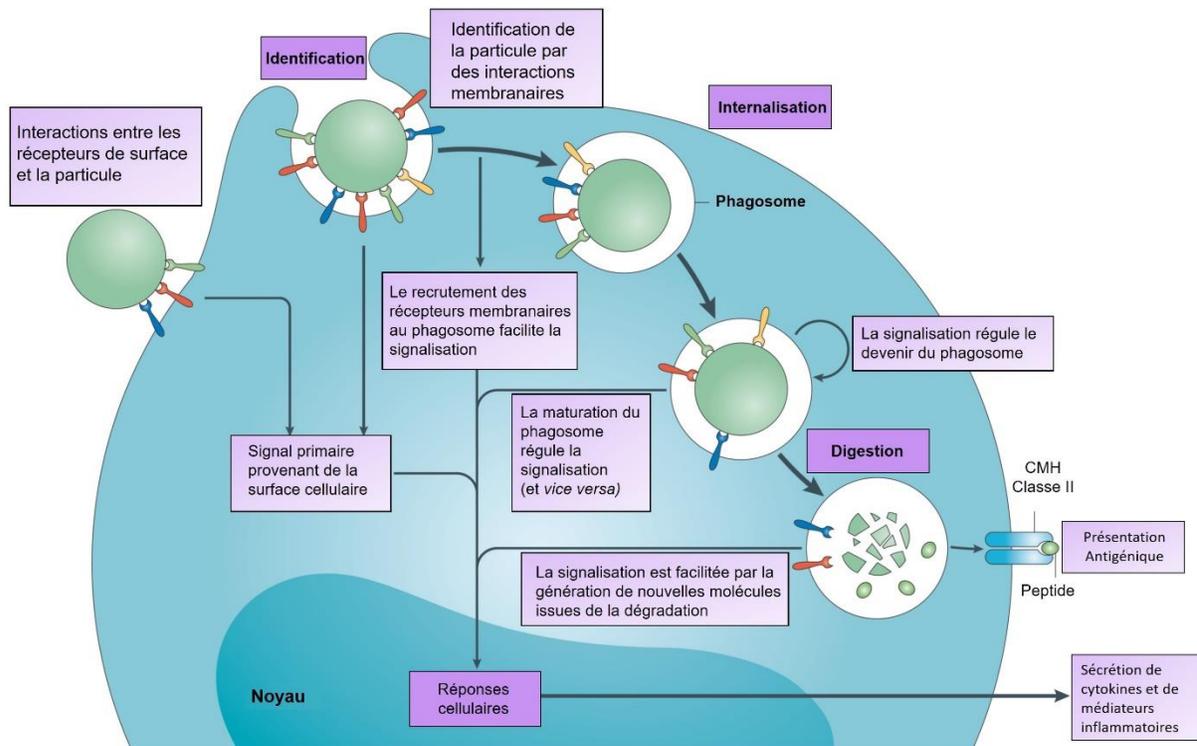


Figure 9. Principales étapes de la phagocytose. Les interactions entre les récepteurs de surface et les protéines membranaires du phagocyte permettent l'identification de la particule cible. Une fois identifiée, la particule est internalisée puis dégradée suivant le recrutement d'enzymes hydrolytiques et à l'acidification du phagolysosome. Les molécules issues de la dégradation de la particule peuvent ensuite être présentées aux lymphocytes afin d'enclencher la réponse immunitaire adaptative. À chaque étape, le phagocyte acquiert l'information nécessaire afin d'initier la réponse adéquate pour chaque type de particule.

Modifié de (Underhill *et al.*, 2012a)

4.3.3.1 La phagocytose effectuée par l'entremise des récepteurs FcRy

Les FcR qui reconnaissent la portion constante des immunoglobulines peuvent être classés selon leur capacité à activer ou à inhiber les cellules qui les expriment. Ainsi, les récepteurs activateurs regroupent le FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) et FcγRIII (CD16) qui possèdent un domaine « immunoreceptor tyrosine-based activation motif » (ITAM) dans leur portion cytoplasmique permettant ainsi le recrutement de différentes kinases nécessaires pour enclencher les différents événements de signalisation permettant, entre autres, l'internalisation de particules opsonisées. Au contraire, le FcγRIIB (CD32B) ayant un rôle inhibiteur, ne possède pas de domaine ITAM et ne participe pas à la phagocytose. L'engagement des FcR suivant la reconnaissance de la

particule mène à la phosphorylation du motif ITAM par des kinases membre de la famille Src telles que Hck, Lyn ou Fgr et le recrutement subséquent de la protéine kinase Syk grâce à son domaine SH2 (Agarwal *et al.*, 1993, Ghazizadeh *et al.*, 1994, Ghazizadeh *et al.*, 1995, Hamada *et al.*, 1993, Johnson *et al.*, 1995, Kiener *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1994). Le rôle de ces protéines dans la phagocytose effectué par l'entremise des FcR est primordial puisque les cellules n'exprimant pas Hck, Lyn, Fgr ou Syk possèdent des capacités réduites à exercer la phagocytose de particules opsonisées par des IgG (Cox *et al.*, 1996, Crowley *et al.*, 1997, Fitzer-Attas *et al.*, 2000, Kiefer *et al.*, 1998). L'activation de Syk initie les différentes voies de signalisation dont celle de la PI3K/Akt ce qui mène à la transcription de différents gènes, au réarrangement du cytosquelette et à la sécrétion de médiateurs inflammatoires (Getahun *et al.*, 2015). Une fois la particule liée aux FcR et les événements de signalisation initiés, la cellule débute son internalisation, par le recrutement de membrane, de myosine et la mobilisation du cytosquelette d'actine. La coordination de l'ensemble de ces processus est assurée par des mécanismes impliquant la PI3k/Akt et de petites GTPase de la famille Rho telles que Cdc42 et Rac (Goodridge *et al.*, 2012).

4.3.3.2 La phagocytose par les lectines

Les phagocytes professionnels expriment aussi à leur surface plusieurs lectines permettant la reconnaissance de carbohydrates endogènes ou exogènes contribuant à l'identification de microbes, notamment les organismes fongiques. Parmi ces lectines, on retrouve le récepteur du mannose (MR) et le récepteur dectin-1 qui lient respectivement l' α -mannan et le β -glucan, deux composantes de la paroi de certains microbes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'expression de l'un ou l'autre de ces récepteurs permettent la phagocytose de particule de zymosan, issus de *S. cerevisiae* par les cellules normalement non phagocytaires. Dectin-1 possède un domaine ITAM dans sa région cytoplasmique et la liaison de β -glucan initie sensiblement les mêmes voies de signalisation que l'engagement des FcR. Ainsi, suivant la liaison de zymosan ou de β -glucan, les protéines membres de la famille Src phosphoryle le domaine ITAM de dectine-1 permettant de recruter Syk et d'enclencher les mécanismes menant à l'internalisation de la particule. Toutefois, selon le type cellulaire étudié, la nécessité de l'un ou l'autre de ces intermédiaires de signalisation varie et cette variabilité s'explique par le fait que d'autres récepteurs, tels que le MR et le CR3, sont aussi impliqués dans la phagocytose de

zymosan ou bien par une certaine redondance avec d'autres protéines de la famille Src ou Zap70, une protéine similaire à Syk (Goodridge *et al.*, 2012, Goodridge *et al.*, 2009).

4.3.3.3 La phagocytose par les récepteurs du complément

Certaines composantes des protéines du complément peuvent servir d'opsonine et ainsi participer à la reconnaissance et l'internalisation de particules diverses. Ainsi, les monocytes et les macrophages expriment plusieurs récepteurs du complément (CR). Par exemple, le CR1 exprimé notamment à la surface des monocytes, possède un domaine extracellulaire de lectine qui permet la reconnaissance de différentes opsonines microbiennes telles que le C1q, C4q, C3b et la lectine liant le mannan (MBL) (Ghiran *et al.*, 2000, Klickstein *et al.*, 1997, Ross, 2000). Bien que le CR1 augmente la phagocytose effectuée par l'entremise des FcR et celle de particules opsonisées par la MBL, il est incapable de déclencher l'internalisation de la particule en absence de signaux supplémentaires. Il contribuerait davantage à la reconnaissance et la liaison de la particule qu'à son internalisation à proprement parler (Ghiran *et al.*, 2000, Klickstein *et al.*, 1997). Les monocytes et les macrophages expriment également le CR3 (aussi nommé Mac-1 ou CD11b/CD18) qui permet la reconnaissance de la composante du complément iC3b. Comme pour le CR1, le CR3 nécessite d'autres signaux tels que le TNF ou le LPS pour mener à l'internalisation de la particule (Wright *et al.*, 1985).

4.3.3.4 La phagocytose par les récepteurs scavenger

Les SR forment une famille de récepteurs initialement reconnue pour lier et amorcer l'internalisation de lipoprotéines modifiées. De plus, il est maintenant connu que certains d'entre eux peuvent également lier d'autres macromolécules telles que le LPS et ainsi favoriser la reconnaissance et l'internalisation de certaines particules. Par exemple, le SR-A exprimé à la surface des macrophages permet la liaison et l'internalisation de bactéries. Par conséquent, la phagocytose de bactéries est altérée dans les macrophages déficients en SR-A. De plus, un autre SR nommé MARCO, exprimé à la surface des macrophages, possède différents ligands, dont les bactéries (Gram positive et négative) et les particules de latex. L'inhibition de MARCO réduit

l'efficacité d'internalisation de ces particules (Peiser *et al.*, 2000, Thomas *et al.*, 2000, van der Laan *et al.*, 1999).

4.3.3.5 La phagocytose de cellules apoptotiques

L'élimination par apoptose des cellules endommagées ou devenues inutiles fait partie intégrante de la formation, de la différenciation et du maintien de l'homéostasie des tissus. De plus, dans certaines conditions, une quantité impressionnante de cellules apoptotiques peut être générée, par exemple suivant une blessure ou un trauma qui déclenche une réponse inflammatoire. Les granulocytes, majoritairement les neutrophiles, sont recrutés massivement au foyer inflammatoire et contribuent à augmenter la quantité de cellules apoptotiques à éliminer. L'élimination efficace des cellules apoptotiques par les phagocytes professionnels ou les cellules environnantes avant qu'elles n'entrent en nécrose secondaire permet de prévenir la libération de composés toxiques ou pro-inflammatoires (Duffin *et al.*, 2010). Plusieurs signes pathologiques incluant une inflammation accrue, des dommages aux tissus et l'accumulation de cellules mourantes sont communs à plusieurs maladies inflammatoires chroniques. Ainsi, l'échec d'une phagocytose efficace des corps et des cellules apoptotiques est suspecté de jouer un rôle crucial dans le développement de nombreuses maladies auto-immunes et inflammatoires telles que le SLE, la fibrose kystique et l'AR (Hanayama *et al.*, 2004, Huynh *et al.*, 2005, Munoz *et al.*, 2005, Vandivier *et al.*, 2002). De plus, une réponse immune générant des auto-Ac serait causée par l'accumulation de cellules apoptotiques ce qui diminuerait l'efficacité de la résolution et aggraverait l'inflammation chronique (Hanayama *et al.*, 2004, Munoz *et al.*, 2005).

Plusieurs facteurs contribuent à la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages. La modification des molécules exprimées à la surface des cellules lors de l'apoptose contribue de manière importante à leur reconnaissance par les phagocytes. Une panoplie de combinaison ligand-récepteur existe ce qui crée une certaine redondance dans les mécanismes d'élimination des cellules apoptotiques. Cette redondance souligne la nécessité d'éliminer ces cellules rapidement et efficacement. Parmi ces modifications, la perte de l'asymétrie des phospholipides membranaires accompagnée d'une translocation des phosphatidylsérine (PS) vers le feuillet externe de la membrane observée lors de l'entrée en apoptose de différents types cellulaires est sans aucun doute le plus universel et le plus étudié des signaux émis (Erwig *et al.*,

2008, Fadok *et al.*, 1992, Yamanaka *et al.*, 2005). Les PS ainsi exprimées à la surface des cellules apoptotiques jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et la phagocytose de ces cellules par les macrophages (Fadok *et al.*, 1992, Kenis *et al.*, 2006). Malgré la découverte, au début des années 1990, du rôle joué par l'exposition des PS à la surface des cellules apoptotiques dans leur élimination par les phagocytes, ce n'est qu'une décennie plus tard que la caractérisation du récepteur des PS, nommé PSR, fut effectuée (Fadok *et al.*, 2000). L'expression de cette molécule nouvellement identifiée dans différentes lignées cellulaires leur confère la capacité de lier et de phagocyter les cellules apoptotiques (Fadok *et al.*, 2000). De plus, ce récepteur permet aux cellules transfectées d'adopter un comportement anti-inflammatoire en limitant la libération de TNF et en favorisant la libération de TGF- β suivant la liaison de PS (Fadok *et al.*, 2000).

Tel que mentionné précédemment, plusieurs autres récepteurs contribuent également à la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. Par exemple, le CD36, un SR de classe B, est également impliqué dans la phagocytose de cellules apoptotiques. Cette glycoprotéine est exprimée à la surface de plusieurs types cellulaires, dont les plaquettes, les monocytes et les cellules endothéliales (Aderem *et al.*, 1999). Ce récepteur reconnaît différents ligands dont le collagène de type I, la thrombospondine (TSP), le LDL oxydé et la PS (Aderem *et al.*, 1999). La transfection de CD36 permet à différents types cellulaires d'acquérir la capacité de phagocyter plusieurs cellules apoptotiques distinctes telles que les neutrophiles, les fibroblastes et les lymphocytes (Greenberg *et al.*, 2006, Navazo *et al.*, 1996, Ren *et al.*, 1995). Le rôle du CD36 dans l'élimination des cellules apoptotiques *in vivo* est montré par une accumulation de cellules apoptotique aux sites de lésion chez les souris CD36^{-/-} ce qui montre une lacune au niveau de l'efficacité avec laquelle les cellules apoptotiques sont éliminées (Greenberg *et al.*, 2006, Lucas *et al.*, 2006). De façon intéressante, les macrophages issus du péritoine des souris CD36^{-/-} sont incapables de lier la forme oxydée de PS alors que ceux provenant de la souche WT montrent une préférence marquée pour cette forme de PS (Greenberg *et al.*, 2006). Finalement, plusieurs autres récepteurs permettant la phagocytose des cellules apoptotiques sont connus et le lecteur est invité à consulter les articles suivants afin d'en apprendre davantage sur ceux-ci (Aderem *et al.*, 1999, Erwig *et al.*, 2008, Fadeel *et al.*, 2010, Fullard *et al.*, 2009, Krieser *et al.*, 2002). Les récepteurs exprimés par les monocytes et les macrophages qui sont impliqués dans la phagocytose sont répertoriés au tableau 6.

Tableau 6 : Récepteurs impliqués dans la phagocytose.

Type de récepteur	Ligands
FcγRI (CD64)	Particules opsonisées par IgG, CRP et SAP
FcγRII (CD32)	Particules opsonisées par IgG, CRP et SAP
FcγRIII (CD16)	Particules opsonisées par IgG, CRP et SAP
CR1	Particules opsonisées par MBL, C1q, C4b et C3b
CR3	Particules opsonisées iC3b
CR4	Particules opsonisées iC3b
SRA	Bactérie, LPS, Acide lipoteichoïque
MARCO	Bactérie, cellule apoptotique
Récepteur du mannose (CD206)	Mannan, levure
Dectin-1	B1,3 –glucan, levure
CD14	LPS, peptidoglycan

CR : récepteur du complément, SRA : récepteur scavenger A, CRP : C-reactive protein, SAP : Serum amyloid P, MBL : Mannose binding lectine

Adapté de Underhill *et al.* (2002)

4.3.4 La sécrétion de métalloprotéases de la matrice

La famille MMP comprend 23 membres chez l'humain qui reconnaissent différents substrats. Ces protéases sont notamment caractérisées par un motif très conservé qui est composé de trois histidines permettant la liaison d'un ion de zinc (Zn^{2+}) au site catalytique d'où leur appellation de métalloprotéase. En réponse à différents stimuli, les MMP peuvent être sécrétées ou retrouvées ancrées à la membrane d'une grande variété de cellules. Différents mécanismes permettent le contrôle de l'activité des MMP, dont leur production sous forme de zymogène, la disponibilité de leur substrat et la présence d'inhibiteurs dans le tissu. Par exemple, des inhibiteurs spécifiques des MMPs nommés « tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) » sont sécrétés par les différents tissus du corps ce qui permet une régulation de l'activité des MMP adaptée à chacun d'entre eux (Baker *et al.*, 2002). De par leur capacité à dégrader plusieurs composantes de la matrice extracellulaire, les MMP sont essentielles à son renouvellement, sa dégradation et son remodelage. En plus de la matrice extracellulaire, les MMP peuvent aussi cliver différentes cytokines et chimiokines (Nissinen *et al.*, 2014, Parks *et al.*, 2004). Par exemple, MMP-2 et MMP-9 peuvent non seulement cliver la proforme de l'IL-1 β et permettre à la forme active d'être libérée, mais également de cliver l'IL-1 β mature et ainsi désactiver son activité biologique (Ito *et al.*, 1996, Schonbeck *et al.*, 1998). De manière similaire, les MMP peuvent réguler la concentration de diverses molécules chimioattractantes et ainsi contrôler le recrutement de différents leucocytes

aux sites inflammatoires. Ainsi, les produits du clivage de MCP-1, -2, -3 et -4 par MMP-1 résultent en des antagonistes du CCR1, du CCR2 et du CCR3 affectant le recrutement de différents leucocytes, dont les monocytes. De plus, les produits de dégradation des chimiokine MCPs réduisent l'inflammation dans un modèle d'inflammation de la patte chez le rat (McQuibban *et al.*, 2002). Également, le clivage de l'IL-8 par MMP-9 potentialise son activité (Van den Steen *et al.*, 2000). En somme, en plus de leur rôle dans la réorganisation de la matrice extracellulaire, les MMP régulent également tous les niveaux des processus inflammatoires notamment en augmentant la perméabilité vasculaire facilitant ainsi l'extravasation des leucocytes et en modifiant l'activité et la disponibilité de différents médiateurs de l'inflammation.

4.3.5 La sécrétion de cytokines

En plus de leur rôle dans l'élimination des pathogènes, des particules étrangères, des cellules apoptotiques et des débris tissulaires, les monocytes et les macrophages régulent également les différentes étapes de la réponse inflammatoire. Pour ce faire, ils sécrètent des médiateurs solubles tels que les cytokines, les médiateurs lipidiques et les chimiokines permettant de coordonner non seulement l'inflammation, mais également le maintien ou le retour à l'homéostasie des tissus. Bien évidemment, le profil de cytokines produites par les macrophages sera influencé par le type de stimuli auxquels ils sont exposés. Il est bien connu que la détection d'un agent pathogène, la phagocytose de particule opsonisée et la présence de médiateurs pro-inflammatoires tel que l'IFN- γ mènera à l'activation des monocytes et des macrophages. En conséquence, ils sécréteront des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-12 et l'IL-23 qui participeront à mettre en œuvre les différents mécanismes antimicrobiens contribuant à l'élimination de l'agent pathogène (Baggiolini *et al.*, 1994, Byrne *et al.*, 2002, Fadok *et al.*, 1998, Trinchieri, 2003, Voll *et al.*, 1997). De manière similaire, la présence de cellules nécrotiques résultantes d'une infection ou d'un traumatisme au tissu stimulera la sécrétion de TNF et d'IL-6 par les macrophages (Cocco *et al.*, 2001). Ainsi, la sécrétion de TNF et d'IL-8 facilite le recrutement des leucocytes notamment en augmentant la perméabilité de l'endothélium vasculaire et en agissant comme chimioattractant (Baggiolini *et al.*, 1994, Marcos-Ramiro *et al.*, 2014). L'IL-12, pour sa part, favorise le développement d'une réponse T_{H1} où davantage d'IFN- γ sera produit par les lymphocytes ce qui soutiendra l'activation des monocytes et des macrophages et ainsi la réponse inflammatoire (Trinchieri, 2003). De plus, les macrophages peuvent également

exprimer du TNF membranaire qui cause la mort cellulaire de manière dépendante du contact entre les cellules (Allenbach *et al.*, 2006, Meszaros *et al.*, 2000). Une expression persistante de plusieurs de ces cytokines, notamment l'IL-6 et le TNF, est associée à plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes telles que l'AR et le SLE (McInnes *et al.*, 2007, Ronnblom *et al.*, 2010).

Lorsque la cause d'une réponse inflammatoire est en voie d'être éliminée, cette dernière doit être progressivement atténuée afin de permettre la mise en place des processus permettant sa résolution et ainsi éviter des dommages excessifs au tissu (Nathan, 2002). Ainsi, le microenvironnement dans lequel se retrouvent les monocytes et les macrophages change et favorise la modification de leurs phénotypes vers les macrophages régulateurs et les macrophages réparateurs. L'accumulation de cellules apoptotiques et leur élimination subséquente par les macrophages sont des facteurs permettant ce changement environnemental. Par exemple, l'ajout de neutrophiles apoptotiques dans une culture de monocytes stimulés au LPS est suffisant pour inhiber leur sécrétion de TNF, d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12, de MCP-1 et de MIP-1 α et, en contrepartie, stimuler la sécrétion de TGF- β et d'IL-10, deux cytokines ayant des propriétés anti-inflammatoires (Byrne *et al.*, 2002, Duffield *et al.*, 2001, Fadok *et al.*, 1998, Freire-de-Lima *et al.*, 2000, Voll *et al.*, 1997). Le même phénomène est observé dans les macrophages non stimulés ou activés par les puissants agonistes classiques tels que le TNF ou l'IFN- γ (Duffield *et al.*, 2001, Fadok *et al.*, 1998, Freire-de-Lima *et al.*, 2000, Huynh *et al.*, 2002, McDonald *et al.*, 1999). L'engagement de certains récepteurs reconnaissant les cellules apoptotiques tel que le CD36, celui de la vitronectine ($\alpha_v\beta_3$ intégrine) et le récepteur de la phosphatidylsérine jouent un rôle majeur dans la sécrétion de TGF- β (Freire-de-Lima *et al.*, 2000, Huynh *et al.*, 2002, Voll *et al.*, 1997). De plus, l'IL-10 ainsi sécrétée peut agir de manière autocrine et inhiber davantage la sécrétion de TNF, d'IL-1 et d'IL-6 par les macrophages (Fiorentino *et al.*, 1991). Ainsi, la phagocytose de cellules apoptotiques par les macrophages atténue la réponse inflammatoire et contribue à la résolution de l'inflammation. Toutefois, l'altération ou la dérégulation des fonctions réparatrices des macrophages mènent à l'apparition de pathologies, dont la fibrose (Wynn *et al.*, 2016).

Hypothèse du projet de recherche

L'implication de l'IL-21 dans le développement de plusieurs pathologies inflammatoires est indéniable. Différentes stratégies, telles que l'utilisation de protéines de fusion (IL-21.Fc) permettant le blocage de l'IL-21 endogène, ont notamment permis d'illustrer son rôle dans le développement de l'AR et du SLE (Bubier *et al.*, 2007, Herber *et al.*, 2007, Ryu *et al.*, 2015, Young *et al.*, 2007). Il est donc normal que différentes stratégies thérapeutiques ciblant directement l'IL-21 ou les intermédiaires dans les voies de signalisation qu'elle active aient été développées afin de réduire la progression de la maladie chez les individus atteints. Toutefois, malgré une augmentation constante des connaissances et une bonne caractérisation de l'effet de l'IL-21 sur les cellules de la lignée lymphoïde, un manque flagrant de connaissances portant sur les effets de cette cytokine sur les cellules de la lignée myéloïde demeure. En raison de l'importance des monocytes/macrophages durant l'inflammation et la défense de l'organisme, il devient incontournable d'étudier l'effet de cette cytokine sur ces acteurs de l'inflammation afin de mieux anticiper les effets de l'utilisation de telles stratégies sur leur physiologie cellulaire respective. Étant donné le peu d'information disponible concernant l'étude de l'interaction IL-21-monocytes/macrophages, il est primordial d'étudier le rôle de l'IL-21 sur ces cellules en parallèle et ainsi caractériser l'effet de cette cytokine sur leurs principales fonctions. Compte tenu du rôle de l'IL-21 et de celui des monocytes/macrophages durant l'inflammation et des données issues de la littérature, l'hypothèse de recherche du présent projet de doctorat est :

La biologie des monocytes et des macrophages humains est modulée par l'IL-21.

Objectifs du projet de recherche

Objectif général

Caractériser l'effet de l'IL-21 sur certaines fonctions des monocytes et des macrophages ainsi que les voies de signalisation impliquées.

Objectifs spécifiques

- 1- Déterminer l'expression du récepteur de l'IL-21 sur les cellules suivantes : la lignée cellulaire THP-1, les monocytes humains primaires et les macrophages différenciés à partir de monocytes humains.
- 2- Déterminer l'effet de l'IL-21 sur les fonctions des monocytes et des macrophages, à savoir : la phagocytose, la production de cytokines, l'adhésion cellulaire.
- 3- Déterminer les voies de signalisation régulées par l'IL-21 qui sont impliquées dans la modulation de ces fonctions : Jak/STAT, MAPK, PI3K/AKT, Syk.

SECTION 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES

Article 1

Titre

IL-21 Enhances Phagocytosis in Mononuclear Phagocyte Cells: Identification of Spleen Tyrosine Kinase as a Novel Molecular Target of IL-21

Auteurs

Francis Vallières et Denis Girard

Publié dans la revue

Journal of Immunology. 2013 Mar 15; 190(6) : 2904-2912

Contributions personnelles

J'ai effectué l'ensemble des expériences de ce papier. J'ai effectué l'analyse et la mise en forme des résultats. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit

Contributions des autres auteurs

Denis Girard a participé à la planification des expériences, à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la rédaction du papier.

Résumé de l'article 1 en français

L'IL-21 augmente la phagocytose des phagocytes mononucléés : identification de la Spleen tyrosine kinase comme nouvelle cible moléculaire de l'IL-21

Le rôle du système IL-21/IL-21R dans les monocytes/macrophages humains n'est pas bien caractérisé et l'expression de l'IL-21R est même parfois contestée. Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois, à notre connaissance, que la lignée cellulaire THP-1 exprime à sa surface les deux composantes de l'IL-21R, soit le CD132 (γ_c) et l'IL-21R α . De plus, nous montrons que l'IL-21 augmente la phagocytose effectuée par l'entremise des FcR, sans toutefois moduler l'endocytose. La capacité de l'IL-21 à accroître la phagocytose n'était pas associée à une augmentation de l'expression de son récepteur à la surface des cellules. De plus, aucune synergie n'a été observée entre l'IL-21 et l'IL-15. L'IL-21 active la « Spleen tyrosine kinase » tel que démontré par sa capacité à augmenter la phosphorylation de cette protéine. Nous avons montré l'implication de l'activation de Syk dans l'augmentation de la phagocytose par l'IL-21 en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de Syk et en réduisant son expression protéique par des oligonucléotides anti-sens. De plus, nous montrons que le CD132 et l'IL-21R α sont exprimés à la surface des monocytes primaires humains et les macrophages dérivés des monocytes différenciés au GM-CSF. De plus, l'IL-21 accroît également les capacités de phagocytose de ces cellules. Nous concluons donc que l'IL-21 possède des effets biologiques dans les phagocytes mononucléés et que Syk est une nouvelle cible moléculaire de l'IL-21 qui était jusqu'à maintenant inconnue. Par conséquent, le développement futur de stratégies thérapeutiques visant le système IL-21/IL-21R devrait tenir compte que la physiologie des monocytes et des macrophages pourrait en être affectée.

IL-21 Enhances Phagocytosis in Mononuclear Phagocyte Cells: Identification of Spleen Tyrosine Kinase as a Novel Molecular Target of IL-21

Francis Vallières and Denis Girard

The biological significance of the IL-21/IL-21R system in human monocytes/macrophages is not well documented, and the expression of IL-21R is unclear and has been disputed. In this study, we showed for the first time, to our knowledge, that human monocyte-like THP-1 cells expressed the two IL-21R components, CD132 (γ c) and IL-21R α , on their cell surface, as assessed by flow cytometry. Moreover, IL-21 was found to enhance FcR-mediated phagocytosis, but not endocytosis. The ability of IL-21 to enhance phagocytosis was not associated with an increased expression of both IL-21R components at the cell surface, and IL-21 did not act in synergy with IL-15. IL-21 activated spleen tyrosine kinase (Syk), as evidenced by its ability to increase Syk phosphorylation. Using a pharmacological approach to inhibit Syk activity, and an antisense technique to downregulate Syk protein expression, we demonstrated the importance of Syk in IL-21-induced phagocytosis. In addition, both CD132 and IL-21R α were expressed on the cell surface of naive monocytes, as well as in GM-CSF–monocyte-derived macrophages. Moreover, IL-21 also induced phagocytosis in these cells. We conclude that IL-21 possesses important biological effects in mononuclear phagocyte cells and that Syk is a novel molecular target of IL-21 that was previously unknown. Therefore, future development of therapeutic strategies targeting the IL-21/IL-21R system should consider that monocyte and macrophage cell physiology may be affected by this system. *The Journal of Immunology*, 2013, 190: 2904–2912.

CD132 (γ c)-dependent cytokines (CD132-DCs), including IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21, play crucial roles in the development, proliferation, survival, and differentiation of multiple cell lineages of both the innate and adaptive immune systems (1–6). IL-21, the most recently discovered of the CD132-DC, mediates biological activities via its receptor, which is composed of CD132 and IL-21R α subunits (7–9). Binding of IL-21 to its receptor leads to activation of the Jak–STAT pathway, predominantly Jak-1, Jak3, STAT1, and STAT3 (1, 7, 8, 10). In addition to the Jak–STAT pathway, IL-21 also activates MAPKs and PI3K pathways (10, 11). Although its roles in lymphoid cells have been (and are still) intensively studied (12–14), the effects of IL-21 in myeloid cells have attracted much less attention (15). In fact, although several studies have demonstrated that IL-21 can inhibit dendritic cell activation and maturation (16–19), its role in other myeloid cells is poorly documented. Moreover, there is presently no evidence that monocytes and/or macrophages express IL-21R α on their cell surface. Although human neutrophils express CD132, they do not express IL-21R α , consistent with the inability of IL-21 to directly activate these cells (11). In contrast, IL-21R α was detected in human premyelocyte

HL-60 cells differentiated toward the monocyte or macrophage phenotype and IL-21R α was also detected by Western blot analysis in both human monocytes and monocyte-derived macrophages (11). A recent study indicated that IL-21 modulated its effect on monocytes by maintaining CD16 expression via the production of IL-10 by human naive CD4⁺ T cells (20). Despite this, the role of IL-21 on phagocytosis, a major function of myeloid cells, is presently unknown. In this study, we report for the first time, to our knowledge, that mononuclear cells express IL-21R α on their cell surface and that IL-21 enhances FcR-mediated phagocytosis in the human monocytic cell line THP-1, as well as in isolated monocytes and GM-CSF–monocyte-derived macrophages. In addition, using a pharmacological approach as well as an antisense strategy, we have demonstrated that spleen tyrosine kinase (Syk) is a novel and important target of IL-21 for enhancing phagocytosis.

Materials and Methods

Reagents

RPMI 1640 medium, HEPES, penicillin/streptomycin, heat-inactivated FBS, Opti-MEM, and HBSS were purchased from Invitrogen (Grand Island, NY). The anti-phospho-specific Erk1/2 Ab was purchased from BioSource International (Camarillo, CA), and the rabbit polyclonal Erk1/2 Ab was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-sheep RBCs, FITC-dextran, piceatannol, and trypan blue were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ficoll-Paque was obtained from GE Healthcare BioScience (Uppsala, Sweden). Cytokines (GM-CSF, IL-15, and IL-21) were purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ). Anti-IL-21R α Ab was from R&D Systems (Minneapolis, MN), and anti-IL-2R γ (CD132) and anti-Syk Abs were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-phosphorylated Syk and Akt were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Sheep RBCs (SRBCs) were purchased from Lampire Biological Laboratories (Pipersville, PA). All secondary Abs were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Cell culture, isolation of monocytes, and preparation of monocyte-derived macrophages

THP-1 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with

Laboratoire de Recherche en Inflammation et Physiologie des Granulocytes, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

Received for publication July 12, 2012. Accepted for publication January 10, 2013.

This work was supported by the Canadian Institutes of Health. F.V. holds a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Master of Science award.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Denis Girard, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. E-mail address: denis.girard@iaf.inrs.ca

Abbreviations used in this article: CD132-DC, CD132 (γ c)-dependent cytokine; HMDM, human monocyte-derived macrophage; MFI, mean fluorescence intensity; SRBC, sheep RBC; Syk, spleen tyrosine kinase.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1201941

2.05 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 10% FBS and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were subcultured before reaching a concentration of 8 × 10⁵ cells/ml, as recommended by the American Type Culture Collection. Human PBMC were isolated from venous blood of healthy volunteers by centrifugation over Ficoll-Paque. Blood donations were obtained from informed and consenting individuals as per institutionally approved procedures.

For monocyte isolation, 25 × 10⁶ PBMC were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 2 h in RPMI 1640 medium and 10% autologous heat-inactivated serum in petri dishes. Monocytes obtained by removing the nonadherent PMBC were further incubated in RPMI 1640 medium–10% heat-inactivated FCS HEPES and penicillin/streptomycin for another 12 h. The monocytes were washed twice with HBSS without Ca²⁺ and Mg²⁺ with 2 mM EDTA and harvested with a cell scraper. Human monocyte-derived macrophages (HMDM) were generated by incubating 2 × 10⁶ PBMC at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 2 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum in 48-well plates. Monocytes obtained by removing the nonadherent PMBC were further incubated in RPMI 1640 medium–10% heat-inactivated FCS HEPES, penicillin/streptomycin supplemented with 2 ng/ml GM-CSF to obtain macrophages. In all cases, cell viability was assessed by trypan blue exclusion prior to experiments.

Cells surface expression of IL-21R

Cells (1 × 10⁶) were incubated with 20 μg/ml anti-IL-2R γ , anti-IL-21R α or with the appropriate isotypic control Abs for 30 min on ice, and then washed twice with ice-cold PBS. Cells were then incubated for another 30 min on ice in the dark with the appropriate secondary FITC-conjugated Ab. Cells were washed twice with ice-cold PBS before being resuspended at 1 × 10⁶ cells/ml. Cell surface expression was immediately detected using a FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA). In some experiments, cells were treated with 50 ng/ml IL-21 for 30 min prior to investigating cell surface expression of IL-21R components.

Phagocytosis assay

SRBCs were washed three times in ice-cold PBS, resuspended at 50 × 10⁶ cells/ml, and then opsonized with anti-SRBC Ab (1:200) at 37°C for 45 min, as documented previously (21). THP-1 cells (10 × 10⁶/ml) or monocytes (5 × 10⁶ cells/ml) were treated with the agonists indicated in the corresponding figure legends in RPMI 1640 medium for 30 min. The medium was removed following centrifugation and opsonized SRBCs were added to the cell pellet at a 5:1 ratio and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 45 min. After incubation with SRBCs, the samples were centrifuged at 200 × g for 10 min at 4°C. Supernatants were discarded, and pellets were subjected to osmotic shock by resuspending the cells with 400 μl H₂O for 15 s. Osmolarity was then restored by the addition of 4.5 ml ice-cold PBS. The samples were then washed twice, and the final pellets were suspended in 400 μl PBS. A minimum of 250 cells/condition were counted, and the percentage of cells having ingested at least one opsonized SRBC was calculated for each condition, and the results are presented as the fold increase, which was obtained by dividing the percentage value of the tested condition by the percentage value of the control or basal level. In some experiments, cells were preincubated for 30 min at 37°C with piceatannol (30 mM) or Syki II (1 mM) before the phagocytosis assay.

Before the assay, HMDM were washed twice with warm HBSS and then stimulated with IL-21 at 50 ng/ml RPMI 1640 medium in a total volume of 100 μl for 30 min at 37°C. These macrophages, and 10 × 10⁶ SRBCs were cocultured for 15 min at 37°C. The plates were then removed and placed on ice for 5 min. Cells were washed once with ice-cold HBSS to remove excess of noningested SRBCs. An osmotic shock was performed by adding 100 μl ice-cold H₂O for 15 s. Osmolarity was restored by adding 1 ml ice-cold HBSS. Wells were then stained with Hema-3 stain set (Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ) and observed under a light microscope. A minimum of 250 cells/condition was counted, and the results are presented as the fold increase, obtained by dividing the percentage value of the tested condition by the percentage value of the control. In some experiments, cells were preincubated for 30 min at 37°C with piceatannol (30 mM) or Syki II (1 mM) before the phagocytosis assay.

Endocytosis assay

THP-1 cells were incubated with 1 mg/ml FITC-dextran for 30 min at 37°C. Cellular uptake of FITC-dextran was then monitored by flow cytometry at 525 nm. A negative control was performed in parallel by incubating cells with FITC-dextran at 4°C instead of 37°C. Uptake of FITC-dextran was expressed as the Δ mean fluorescence intensity (MFI); MFI (uptake at 37°C) – MFI (uptake at 4°C) as described previously (22).

Antisense experiments

THP-1 (5 × 10⁵/ml) were incubated with a mixture of two Syk antisense oligonucleotides previously used (23, 24): (5'-CTCGGATCAGGAACCTTCCAT-3' and 5'-CATGGAACCTGATGAACCAG-3') or scrambled (Scr) antisense: (5'-TCGACA-AGTCGACTTTCATCG and 5'-GATGGAACCTGCAGATACCA) with a phosphorothioate backbone at a final concentration of 5 μM each at 37°C in Opti-MEM without addition of serum for 6 h to increase uptake of the oligonucleotides. Subsequently, cells were cultured for 22 h in Opti-MEM supplemented with 5% FBS. Transfection efficiency was >90% as determined by using the same oligonucleotide sequences with a Cy3 fluorophore coupled to the 5' end and then visualized by fluorescence microscopy. After transfection, phagocytosis was determined as described above. The level of Syk protein expression was monitored by Western blot analysis.

Western blotting

Cells in RPMI 1640 medium were stimulated with IL-21 (50 ng/ml), GM-CSF (65 ng/ml), or the diluent (HBSS) for indicated periods of time at 37°C, followed by lysis in Laemmli's sample buffer (0.25 M Tris-HCl [pH 6.8], 8% SDS, 40% glycerol, and 20% 2-ME). Aliquots of extracts corresponding to 3.5 × 10⁵ cells were loaded onto 7.5% SDS-PAGE gels, followed by electrophoresis, and then transferred to nitrocellulose membranes for detection of p-Syk, p-Akt, p-ERK, Syk, and ERK. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS-Tween containing 3% BSA. After blocking, the primary Abs were added at a final dilution of 1:1000 in TBS-Tween (0.10%). The anti-Syk Ab was added at a final concentration of 1:4000. The membranes were incubated overnight at 4°C, then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with the appropriate HRP-conjugated secondary Abs diluted 1:20,000 in TBS-Tween, followed by several washes. Protein expression was revealed using a Luminata Forte HRP substrate (Millipore, Temecula, CA). Membranes were stripped with Reblot Plus Strong solution (Millipore) and reprobed to verify protein loading. Densitometric analyses were performed using Quantity One, version 4.6.6 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Immunoprecipitation

THP-1 (10 × 10⁶ cells/condition) were treated with the indicated agonists for the indicated period of time at 37°C, centrifuged, and lysed in nondenaturing cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8], 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 125 mM PMSF, 10 g/ml trypsin inhibitor, aprotinin, leupeptin, and pepstatin, and 1 mM orthovanadate) for 1 h on ice and sonicated three times for 20 s. The lysates were preincubated with protein G-Sepharose (GE Healthcare BioScience). After 1 h, samples were centrifuged to remove Sepharose beads and then incubated with 2 μg/ml mouse anti-human Syk or IL-21R α at 4°C with gentle agitation overnight. Protein G-Sepharose was then added for 4 h with gentle agitation at 4°C. The solid matrix was collected and washed three times with lysis buffer before adding an equivalent volume of sample buffer. The samples were then boiled at 100°C for 10 min. Immunoprecipitates were electrophoresed on an SDS-polyacrylamide gel, followed by Western blot analysis.

Statistical analysis

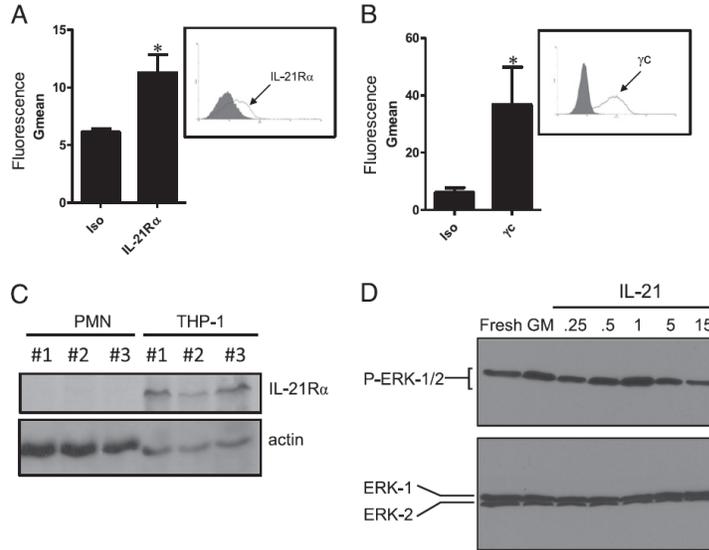
Statistical analyses were performed using Student *t* test or ANOVA, and if significance was identified, individual comparisons were subsequently made by Bonferroni test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was set at *p* < 0.05.

Results

Human monocyte-like THP-1 cells express the IL-21R on their surface and are activated by IL-21

We first determined whether monocyte-like THP-1 cells expressed IL-21R components. Fig. 1A illustrates that resting THP-1 cells expressed IL-21R α (MFI = 11.3 ± 1.5 for IL-21R α versus 6.1 ± 0.3 [*n* = 3] for the corresponding isotypic control given a ratio of 1.9) as assessed by flow cytometry. The other component of the IL-21R, CD132, was also expressed on the cell surface of these cells (MFI = 34.8 ± 9.9 for CD132 versus 5.9 ± 1.2 for the corresponding isotypic control (*n* = 3) (Fig. 1B). The presence of IL-21R α was also confirmed at the protein level by Western blot

FIGURE 1. Cell surface expression of IL-21R in human monocyte-like THP-1 cells. Separate batches of THP-1 cells were cultured and used to determine the cell surface expression of CD132 and IL-21R α by flow cytometry using specific Abs against IL-21R α (A), γ C (B), or the corresponding isotopic controls (Iso) as described in *Materials and Methods*. Results are expressed as Gmean of fluorescence (means \pm SEM, $n = 3$). * $p < 0.05$ versus Iso (Student t test). *Inset*, Data from one representative experiment obtained by FACS analysis. (C) Detection of IL-21R α protein by Western blot in three different THP-1 cell lysates (#1–3). As expected, IL-21R α was not detected in neutrophils (PMN) isolated from three different blood donors (#1–3) even if protein loading was intentionally increased (four times more). (D) Phosphorylation of ERK-1/2 was assessed by Western blot analysis and was used as a marker of cell activation in response to 50 ng/ml IL-21 after 0.25, 0.5, 1, 5, or 15 min versus fresh cells. GM-CSF (GM) was used as a positive control (65 ng/ml for 5 min).



experiments in three different THP-1 cell lysates (Fig. 1C). These results demonstrated that THP-1 cells expressed the full IL-21R, and this prompted us to verify whether IL-21 could activate these cells. Because IL-21 is not mitogenic by itself and knowing that it activates Erk-1/2 in human promyelocytic HL-60 cells and monocytes (11, 25), we next determined whether IL-21 could activate ERK-1/2 in THP-1 cells. As illustrated in Fig. 1D, IL-21 induced a rapid phosphorylation of ERK-1/2 in THP-1 cells where the peak of activation occurred after ~ 1 min and start to decline after 5 min of treatment. These results support the fact that THP-1 cells possess a functional IL-21R.

IL-21 enhances phagocytosis, but not endocytosis, in human monocyte-like cells

Because phagocytosis is one of the most important functions exerted by phagocytes, we next determined whether IL-21 could enhance FcR-mediated phagocytosis using opsonized SRBCs in THP-1 monocyte-like cells. By testing different concentrations of IL-21 (0–500 ng/ml), we found that this cytokine enhanced phagocytosis at maximum biological effect at a ratio of 1.5 ± 0.12 (mean \pm SEM, $n = 3$) at the concentration of 50 ng/ml (Fig. 2A). Therefore, all subsequent experiments with IL-21 were performed at this concentration. In another set of experiments, we compared

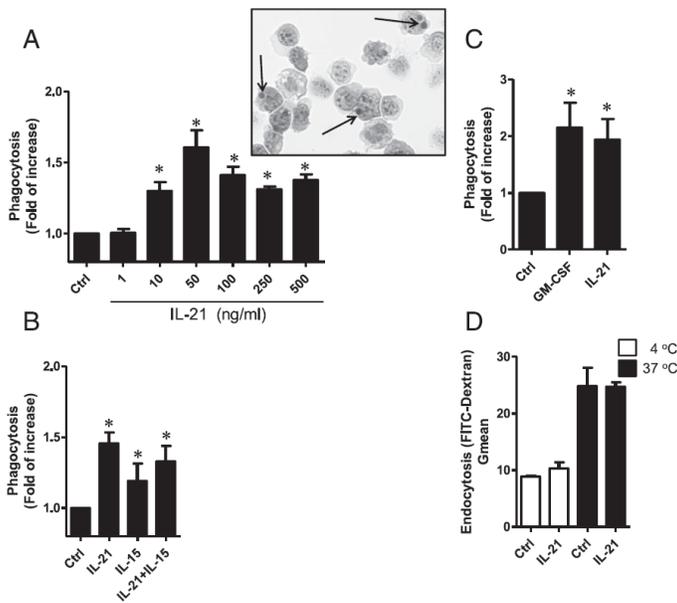


FIGURE 2. IL-21 enhances phagocytosis as strongly as GM-CSF but does not act in synergy with IL-15 and does not promote endocytosis in THP-1 cells. Cells were treated with buffer (Ctrl) or with the indicated concentrations of IL-21 (A) or 65 ng/ml of GM-CSF (GM), IL-15 (50 ng/ml), IL-21 (50 ng/ml), or IL-15 + IL-21 for 30 min and phagocytosis (A–C) or endocytosis (D) was measured as described in *Materials and Methods*. (A) *Inset*, A typical photograph illustrating cells ingesting SRBCs (arrows). (A–C) Results are expressed as ratio (fold of increase: tested/Ctrl). (D) Results are Gmean of fluorescence (means \pm SEM). All experiments were performed at least thrice. Arrows, ingested SRBCs. * $p < 0.05$ versus Ctrl.

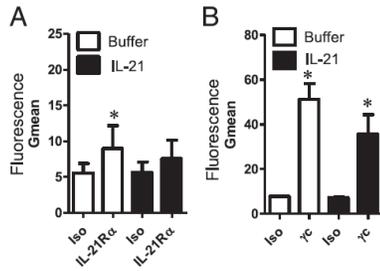


FIGURE 3. IL-21 does not upregulate cell surface expression of CD132 and IL-21Rα in monocyte-like THP-1 cells. The detection of the IL-21R components IL-21Rα (A) and CD132 (γc) (B) was performed after 30 min of treatment with buffer (□) or 50 ng/ml IL-21 (■) by flow cytometry using specific Abs and corresponding isotypic controls (Iso) as described in *Materials and Methods*. Results are expressed of Gmean of fluorescence (means ± SEM; n = 3).

the potency of IL-21 as compared with that of GM-CSF, a non-CD132-DC known to increase phagocytosis in THP-1 cells (26). As illustrated in Fig. 2B, IL-21 is as potent as the cytokine GM-CSF for enhancing phagocytosis, with a slightly diminished ratio of 1.9 ± 0.4 versus 2.2 ± 0.4 (mean ± SEM, n = 4). Because IL-21 is known to act in synergy with IL-15 (27, 28), we then de-

termined whether a similar response could be elicited in monocyte during phagocytosis. As illustrated in Fig. 2C, IL-15 also enhanced phagocytosis in monocytes when used alone, although to a lower extent than IL-21. However, IL-15 did not further increase the ability of IL-21 to enhance phagocytosis, indicating an absence of synergy. Then, we investigated the possibility that IL-21 modulate endocytosis in THP-1 cells. As illustrated in Fig. 2D, IL-21 did not influence endocytosis, as assessed by flow cytometry using the FITC-dextran assay, because the fluorescent signal obtained after IL-21 treatment gave similar results to control cells with a G mean of ~25 in both conditions.

IL-21 does not influence cell surface IL-21R components

The ability of a cytokine to modulate the expression of its own receptor components is a common phenomenon. We determined the cell surface expression of both CD132 and IL-21Rα after 30 min, following cell activation with IL-21, because this is the period of time required to observe that IL-21 enhances phagocytosis. As illustrated in Fig. 3, IL-21 did not significantly modulate cell surface expression of IL-21Rα (Fig. 3A) and CD132 (Fig. 3B). However, a slight (nonstatistically significant) decrease of both receptor components (more observable with CD132) was observed. This may correspond to endocytosis of the receptor complex following ligand binding. Taken together, the results indicate that the ability of IL-21 to enhance phagocytosis could not be attributed

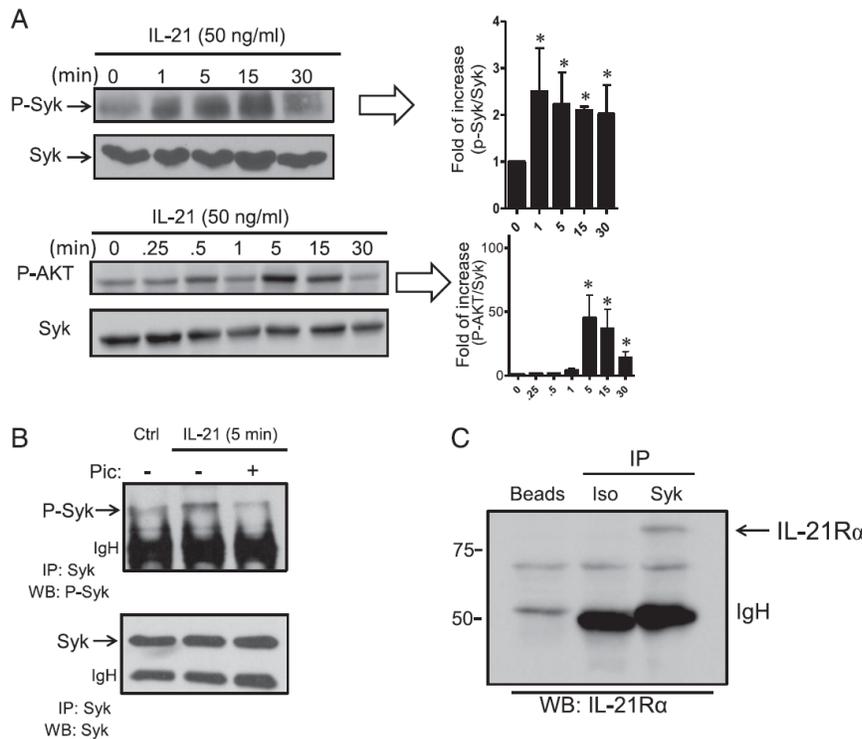


FIGURE 4. Syk and AKT are activated by IL-21 and Syk is associated with IL-21Rα. (A) THP-1 cells were treated with 50 ng/ml IL-21 for the indicated periods of time, and activation of Syk and AKT was determined by Western blot experiments using a phosphospecific Ab against Syk (p-Syk) or against the phosphorylated form of AKT (P-AKT) as described in *Materials and Methods*. Equal loading was verified after stripping and reprobing the membranes with an Ab against the nonphosphorylated form of Syk. Results are from one representative experiment out of three. Densitometry was calculated for each time points (P-syk/Syk) or (P-AKT/SyK), and results were expressed as fold of increase. (B) Cells were treated with buffer (Ctrl) or IL-21 for 5 min in the presence (+) or absence (-) of piceatannol (Pic) and phosphorylated Syk (P-Syk) (upper panel) or Syk (bottom panel) was immunoprecipitated (IP), followed by Western blot (WB) analysis with the anti-Syk Ab. (C) THP-1 cell lysates were prepared and were treated with beads alone, or IP with isotypic control (Iso) or with anti-Syk Ab (Syk) and immunoblotting were then performed with the anti-IL-21Rα Ab. *p < 0.05 versus Ctrl (time = 0).

Downloaded from <http://jimmunol.org/> at INRS-Institut Armand-Frappier (bibliothèque) on March 26, 2013

to its ability to increase cell surface expression of one or the other IL-21R components.

Syk and Akt are activated by IL-21 and Syk is associated with IL-21R α

Syk is an enzyme well-known for its involvement in phagocytosis, and we investigated the possibility that IL-21 activates this kinase. As illustrated in Fig. 4A, upper panel, kinetic experiments revealed that IL-21 activated Syk as quickly as after 1 min of treatment. Such activation was sustained for 15 min and started to decline after ~30 min. IL-21 also activated the Syk substrate Akt. The peak of activation was obtained after 5 min of activation (Fig. 4A, bottom panel). We next performed immunoprecipitation experiments and demonstrated that the IL-21-induced Syk phosphorylation decreased to the basal level in the presence of piceatannol (Fig. 4B) and that Syk is physically associated with IL-21R α (Fig. 4C).

Inhibition of Syk activity and its protein expression markedly decreases the effect of IL-21 on phagocytosis.

We next used two approaches to establish the role of Syk in IL-21-induced cell phagocytosis. First, using two different Syk pharmacological inhibitors (SykII and piceatannol), we found that the biological activity of IL-21 was markedly inhibited by both inhibitors, because the ratio decreased from ~1.8 for IL-21 alone to a ratio close to 1 when cells were pretreated with one or the other inhibitor (Fig. 5A). Second, we used an antisense strategy to downregulate Syk expression. As illustrated in Fig. 5D, the expression of Syk remained similar to that of control cells when Scr-antisense was added to the culture but markedly decreased when

Syk-antisense was added, confirming that Syk-specific oligonucleotides downregulated Syk expression. This correlates with a loss of IL-21 biological activity on phagocytosis only in the presence of Syk-antisense, even though both Scr- and Syk-antisenses were able to enter the cells at the same efficiency, as assessed by immunofluorescence (Fig. 5B, 5C).

Cell surface expression of IL-21R α in peripheral blood isolated human monocytes and modulation of phagocytosis by IL-21

Peripheral blood-isolated human monocytes are known to express CD132 on their cell surface (1, 29, 30), but the expression of IL-21R α in these cells is not clear. Therefore, we next decided to clarify this situation, and as assessed by flow cytometry, primary monocytes were found to express a modest level (but significantly) of IL-21R α on their surface ($p = 0.018$; $n = 3$) (Fig. 6A). Interestingly, the basal level of phagocytosis was increased by IL-21 treatment by a factor 1.24 ± 0.04 ($n = 3$) (Fig. 6B), indicating that monocytes express a functional IL-21R. Interestingly, unlike THP-1 cells, we observed that, in general, more than one SRBC was observed in each cell. Therefore, we decided to calculate a phagocytic index (total number of SRBCs/counted monocytes) and found that the index was 1.5 ± 0.2 in IL-21-treated monocytes versus control cells (Fig. 6B, inset).

IL-21 activates Syk and Akt and enhances phagocytosis in HMDM expressing IL-21R.

We next investigated cell surface expression of CD132 and IL-21R α in GM-CSF-HMDM. Although CD132 was found to be

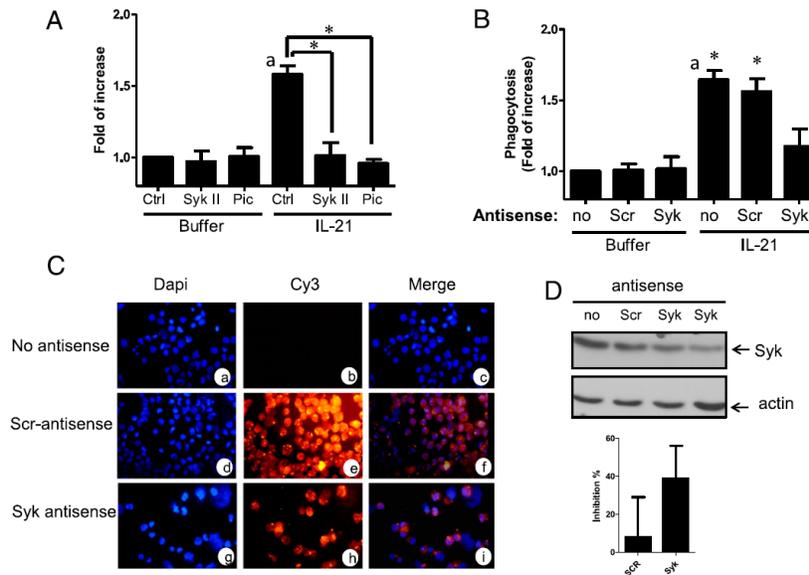


FIGURE 5. Inhibition of Syk by pharmacological approach and antisense strategy markedly decreases the effect of IL-21 on phagocytosis. **(A)** THP-1 cells were pretreated with buffer (Ctrl), Syk inhibitor II (SykII), or piceatannol (Pic) before being incubated in the presence or absence (Ctrl) of IL-21, and then, phagocytosis was determined. **(B–D)** THP-1 cells were incubated in the presence or absence (no) of Syk or scrambled (Scr) antisenses, and phagocytosis was then performed in cells activated or not by IL-21 **(B)**. **(C)** The capacity of antisenses to penetrate into cells was determined using the same oligonucleotide sequences with a Cy3 fluorophore addition at the 5' extremity and then visualized by fluorescence microscopy as described in *Materials and Methods*. Original magnification $\times 40$. Note that both Scr **(d–f)** and Syk **(g–i)** antisenses penetrate into cells as the same efficiency. No background signal was observed in the absence of antisense **(b)**. The nucleus was stained with Dapi **(a, d, g)**, and images were merged **(c, f, i)**. **(D)** The cellular depletion of Syk was determined by Western blot using an anti-Syk Ab. The membrane was then stripped and probed with an anti-actin Ab for verifying protein loading, and densitometric analysis was performed as described in the *Materials and Methods*. ^a $p < 0.05$ versus all conditions without IL-21 treatment. ^{*} $p < 0.05$ versus corresponding control.

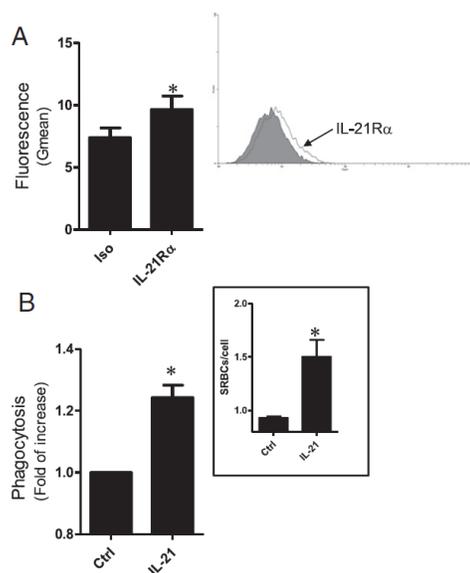


FIGURE 6. Primary human monocytes express IL-21R α on their surface and IL-21 enhances the basal level of phagocytosis. **(A)** Freshly isolated human monocytes were stained with an anti-IL-21R α Ab or the appropriated isotypic control (Iso), and cell surface expression was determined by flow cytometry as described in *Materials and Methods*. **(B)** Primary monocytes were treated with buffer or 50 ng/ml IL-21, and phagocytosis was evaluated as described in *Materials and Methods*. *Inset*, The total number of ingested SRBCs was divided by the number of counted cells to obtain a phagocytic index (ratio: SRBCs/cell). Results are means \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0.05$ versus corresponding control.

highly expressed (Gmean of 112.3 ± 9.8 versus 8.2 ± 0.5 for the corresponding isotypic control [$n = 5$] (Fig. 7B), IL-21R α was modestly, but significantly, expressed (Gmean of 11.6 ± 0.7 versus 9.4 ± 0.4 for the isotypic control [$n = 6$] (Fig. 7A). We then demonstrated that Syk and Akt were activated by IL-21 treatment (Fig. 7C). As for monocytes, IL-21 enhanced phagocytosis in these macrophages by a factor 1.7 ± 0.3 ($n = 5$) (Fig. 7D). Because several SRBCs/macrophages were observed, resulting in a poor resolution for counting the number of SRBC/cells with certainty, we did not calculate the phagocytic index, but this is certainly greater than that observed for monocytes. As for monocytic THP-1 cells (Fig. 5A), inhibition of Syk by the two different pharmacological inhibitors decreased the ability of IL-21 to enhance phagocytosis in macrophages (Fig. 7E).

Discussion

The role of IL-21 is well documented in lymphoid cells (2). This cytokine is known for its ability to augment proliferation of T cells, to drive B cell differentiation into both memory cells and terminally differentiated plasma cells, as well as to enhance NK cell activity (3, 14, 31–34). Except for its ability to negatively regulate dendritic cell functions (16, 19), the role of IL-21 in cells of myeloid origin, such as monocytes and macrophages, is not well documented. Furthermore, data regarding the expression of IL-21R in monocytes and/or macrophages as well as the role of IL-21 in these cells is not clear and is even contradictory. Although Fuqua et al. (25) reported that IL-21 increased the production of IL-8 in human monocytes, we previously demonstrated that IL-21 did not exert such an effect in monocytes but did in

monocyte-derived macrophages from the same blood donors (11). Although monocytes were similarly isolated in the two studies, Fuqua et al. (25) pretreated the cells with 5 mM orthovanadate (an inhibitor of protein tyrosine phosphatases) for 30 min, and then, 50 ng/ml IL-21 was added to a cell suspension of 30×10^6 cells/ml for different periods of time (2–24 h), whereas in our study, monocytes were directly treated with IL-21 (0–500 ng/ml) for 24 h but at a cell density of 1×10^6 cells/ml. Whether these different experimental conditions are the basis of this discrepancy is not clear. Despite this, Fuqua et al. (25) confirmed our previous observation that ERK-1/2 is activated by IL-21 (11). This is agreement with our present study indicating that IL-21 activates ERK-1/2 in THP-1 cells, supporting the fact that these cells express a functional IL-21R. In addition, they demonstrated that inhibition of ERK with the pharmacological inhibitor U0126 reversed the ability of IL-21 to increase the production of GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-7, IL-15, IFN- γ , and TGF- β . Few studies have indicated/suggested that monocytes and/or macrophages express the specific IL-21R α component. IL-21R α was found to be expressed in rat mononuclear leukocytes, as assessed by RT-PCR and Western blot experiments (35). Previously, we reported that human monocytes and monocyte-derived macrophages, but not neutrophils, expressed IL-21R α , as determined by Western blotting experiments (11). Using RT-PCR, in situ hybridization, and Western blotting experiments, IL-21R α was detected in human synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients (36). Intriguingly, it has been reported that 1-d monocytes were virtually devoid of IL-21R α mRNA expression, while 3-d- and 7-d-differentiated dendritic cells expressed IL-21R mRNA in high levels, as assessed by Northern blotting (19); curiously, there are no data regarding naive monocytes. In addition, IL-21R α mRNA expression was detected at low levels in cells committed to macrophage differentiation or in mature macrophages. Although we have shown in this study that THP-1 cells expressed IL-21R α on their cell surface, the expression of this component has been tested by others in 19 different cell lines, including THP-1 and U937 cell lines, but the authors reported that these two cell lines did not possess IL-21R α , because they considered a ratio of relative fluorescence intensity < 1.2 as a negative result (37). Also, it was not specified whether their results were from several experiments or simply one, and unlike our results (ratio of 1.9), there was no illustration of the FACS data. In addition, although they also reported that Raji cells do not express IL-21R α , this cell line has been (and is still) used as a positive control in the data sheet of some companies (e.g., Santa Cruz Biotechnology) for the detection of IL-21R α by Western blot experiments, using an Ab recognizing an immunogen directed against the extracellular domain of human IL-21R α . Moreover, U-937 cells have been used in the study of Fuqua et al. (25), as discussed above, to demonstrate that IL-21 activated ERK-1/2 and by Jüngel et al. (36) to demonstrate the presence of IL-21R α component by Western blot, in which a clear band of ~ 52 kDa was detected.

We also show in this study that Syk is an important target of IL-21 and that this enzyme is physically associated with IL-21R α , similarly to IL-4R α (23), and to the best of our knowledge, this is the first study demonstrating that IL-21 activates Syk. Therefore, Syk should be added to a growing list of enzymes known to be part of the IL-21-induced cell signaling events, including Jak1, Jak-3, STAT1, STAT3, suppressor of cytokine signaling 1, suppressor of cytokine signaling 3, Shc, Akt, and ERK-1/2 (10, 11, 19, 25, 38). We show not only that IL-21 activated Syk but also that inhibition of Syk by pharmacological inhibitors and downregulation of Syk protein expression by an antisense technique reversed markedly the ability of IL-21 to enhance phagocytosis in

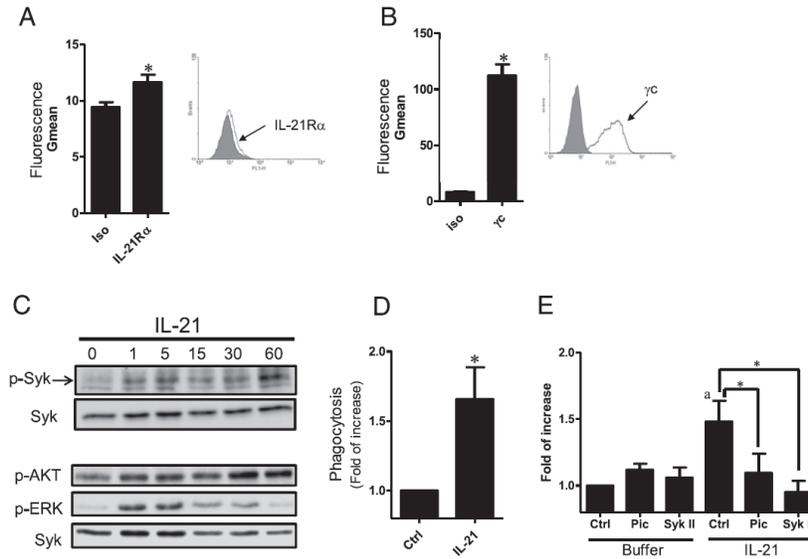


FIGURE 7. GM-CSF-HMDM cells express IL-21R components on their surface, and IL-21 activates Syk, Erk and AKT and enhances phagocytosis in these cells. Freshly isolated human monocytes were treated for 7 d with GM-CSF to generate mature macrophages, and the cell surface expression of IL-21R α (**A**) and γ C (**B**), the activation of Syk, Erk and AKT (**C**), the modulatory activity of IL-21 on phagocytosis (**D**), and the involvement of Syk (**E**) were performed as described in *Materials and Methods*. For (**C**), Syk was used for monitoring equal loading after stripping the membranes; *bottom panel*, the membrane was stripped once after staining with the anti-P-AKT Ab, probed with the anti-P-Erk, restriped and probed with the anti-Syk Ab. ^a $p < 0.05$ versus all conditions without IL-21 treatment. ^{*} $p < 0.05$ versus corresponding control. Results are means \pm SEM ($n \geq 3$) (**A**, **B**) or as fold of increase (**D**, **E**).

THP-1 cells. This strategy has been previously used by us (23) to demonstrate the role of Syk in IL-4-induced neutrophil phagocytosis and adhesion, as well as its ability to delay neutrophil apoptosis, and by others (24) to demonstrate the role of Syk in lamellipodium formation and chemotaxis in leukocytes. Interestingly, phosphorylation and activation of Syk has previously been reported in THP-1 cells after clustering of Fc γ RII in undifferentiated cells (39). These observations open the possibility that IL-21, in mononuclear cells, exerts functions other than phagocytosis, which involve the participation of Syk, an enzyme that is becoming recognized to play crucial roles in several biological functions (40). Moreover, knowing that targeting Syk is relevant to the treatment of inflammatory diseases (41–43), and because IL-21 is associated with a variety of inflammatory disorders, including psoriasis, systemic lupus erythematosus, and arthritis (44–46), our results support the targeting of the IL-21/IL-21R system for the development of therapeutic strategies.

In this study, we have demonstrated that IL-21 did not enhance phagocytosis in THP-1 monocyte-like cells by a mechanism involving upregulation of IL-21R components on the cell surface and that no synergy was noted between IL-21 and IL-15. Therefore, the previously reported synergistic effect of IL-21 and IL-15 in lymphocytes is not a generalized phenomenon and appears to occur, for example, for cell proliferation (27) and cytokine production (28) but not for monocyte phagocytosis (this article). Interestingly, IL-21 was found to be more potent than IL-15 for enhancing phagocytosis in these cells, indicating that cytokines from a same subclass, the CD132-DCs, modulate phagocytosis at different intensities. Also, we observed that IL-21 enhanced phagocytosis as strongly as GM-CSF (not a CD132-DC) in THP-1 cells known to express functional GM-CSFR (47). Interestingly, using radiolabeled recombinant human GM-CSF, THP-1 cells were reported to express fewer than 74 receptors on their surface

(48). This observation is consistent with the fact that a weak expression of IL-21R α is sufficient to induce important biological functions in these cells and argue against the previous findings of Akamatsu et al. (37), which reported that THP-1 cells did not express IL-21R. Although IL-21 enhances FcR-mediated phagocytosis of opsonized SRBCs in monocyte-like THP-1 cells, we also report in parallel that this cytokine does not increase endocytosis of FITC-dextran, a sugar known to bind to mannose receptors (49). Therefore, IL-21 is not a modulator of mannose receptors in THP-1 cells known to possess such receptors that, for example, were previously found to promote phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* (50).

In addition to THP-1 monocyte-like cells, we have demonstrated in this study that primary human monocytes as well as GM-CSF-HMDM not only express IL-21R on their cell surface, but also, to our knowledge, this is the first study demonstrating that IL-21 enhances phagocytosis in these cells. Also, we demonstrated that IL-21 activates Syk in GM-CSF-HMDM and that inhibition of Syk by pharmacological inhibitors diminished the ability of IL-21 to enhance phagocytosis. The expression of IL-21R α was not investigated previously by flow cytometry but rather by RT-PCR, Northern blot, in situ hybridization, or Western blot experiments (11, 35, 36). Curiously, except for the ability to increase the production of cytokines in mononuclear cells, no other functions of IL-21 have been reported in these cells before our present investigation. Recently, however, Liu et al. (20) reported that IL-21 maintained the expression of CD16 on monocytes via the production of IL-10 by human naive CD4⁺ T cells, which is not in itself a direct function, but one can imagine that this observation could be associated with other biological processes.

We present in this study new data demonstrating not only that THP-1, primary monocytes, and GM-CSF-HMDM express IL-21R at their cell surfaces but also that the receptor is fully func-

tional, based on the fact that IL-21 enhances one of the most important biological responses exerted by monocytes, macrophages, and phagocytosis. Therefore, monocytes and macrophages functionally respond to IL-21 and future development of therapeutic strategies targeting the IL-21/IL-21R system should consider that monocyte and macrophage cell physiology may be affected by this system.

Acknowledgments

We thank Mary Gregory for reading the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Kovanen, P. E., and W. J. Leonard. 2004. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the γ (c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol. Rev.* 202: 67–83.
- Rochman, Y., R. Spolski, and W. J. Leonard. 2009. New insights into the regulation of T cells by γ (c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 480–490.
- Liao, W., J. X. Lin, and W. J. Leonard. 2011. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 23: 598–604.
- Osborne, L. C., and N. Abraham. 2010. Regulation of memory T cells by γ c cytokines. *Cytokine* 50: 105–113.
- Akdis, M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, et al. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127: 701–721, e1–e70.
- 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, 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: 559–569.
- 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: 1–5.
- 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: 8725–8731.
- de Toter, D., R. Meazza, S. Zupo, G. Cutrona, S. Matis, M. Colombo, E. Ballerai, I. Pierri, M. Fabbì, M. Capaia, et al. 2006. Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 107: 3708–3715.
- Zeng, R., R. Spolski, E. Casas, W. Zhu, D. E. Levy, and W. J. Leonard. 2007. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood* 109: 4135–4142.
- Pelletier, M., A. Bouchard, and D. Girard. 2004. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J. Immunol.* 173: 7521–7530.
- Alves, N. L., F. A. Arosa, and R. A. van Lier. 2005. IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 175: 755–762.
- Avery, D. T., V. L. Bryant, C. S. Ma, R. de Waal Malefyt, and S. G. Tangye. 2008. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J. Immunol.* 181: 1767–1779.
- Ettinger, R., G. P. Sims, A. M. Fairhurst, R. Robbins, Y. S. da Silva, R. Spolski, W. J. Leonard, and P. E. Lipsky. 2005. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol.* 175: 7867–7879.
- Pelletier, M., and D. Girard. 2007. Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation. *ScientificWorldJournal* 7: 1715–1735.
- Brandt, K., S. Bulfone-Paus, D. C. Foster, and R. Rückert. 2003. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102: 4090–4098.
- Brandt, K., S. Bulfone-Paus, A. Jenckel, D. C. Foster, R. Paus, and R. Rückert. 2003. Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 121: 1379–1382.
- Maeda, M., Y. Yanagawa, K. Iwabuchi, K. Minami, Y. Nakamaru, D. Takagi, S. Fukuda, and K. Ono. 2007. IL-21 enhances dendritic cell ability to induce interferon- γ production by natural killer T cells. *Immunobiology* 212: 537–547.
- Strengell, M., A. Lehtonen, S. Matikainen, and I. Julkunen. 2006. IL-21 enhances SOCS gene expression and inhibits LPS-induced cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 79: 1279–1285.
- Liu, Y., B. Yang, J. Ma, H. Wang, F. Huang, J. Zhang, H. Chen, and C. Wu. 2011. Interleukin-21 maintains the expression of CD16 on monocytes via the production of IL-10 by human naive CD4⁺ T cells. *Cell. Immunol.* 267: 102–108.
- Simard, J.-C., M.-M. Simon, P. A. Tessier, and D. Girard. 2011. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J. Immunol.* 186: 3622–3631.
- Lemarie, A., C. Morzadec, E. Bourdonnay, O. Fardel, and L. Vermhet. 2006. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J. Immunol.* 177: 3019–3027.
- Ennaciri, J., and D. Girard. 2009. IL-4R(α), a new member that associates with Syk kinase: implication in IL-4-induced human neutrophil functions. *J. Immunol.* 183: 5261–5269.
- Schymeinsky, J., C. Then, and B. Walzog. 2005. The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *J. Cell. Physiol.* 204: 614–622.
- Fuqua, C. F., R. Akomeah, J. O. Price, and S. E. Adunyah. 2008. Involvement of ERK-1/2 in IL-21-induced cytokine production in leukemia cells and human monocytes. *Cytokine* 44: 101–107.
- Baqui, A. A., T. F. Meiller, B. F. Turng, J. I. Kelley, and W. A. Falkler, Jr. 1998. Functional changes in THP-1 human monocytic cells after stimulation with lipopolysaccharide of oral microorganisms and granulocyte macrophage colony stimulating factor. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 20: 493–518.
- 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, et al. 2005. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* 201: 139–148.
- Strengell, M., S. Matikainen, J. Sirén, A. Lehtonen, D. Foster, I. Julkunen, and T. Sareneva. 2003. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN- γ production in human NK and T cells. *J. Immunol.* 170: 5464–5469.
- Ariga, T., K. Yamaguchi, J. Yoshida, A. Miyanoshta, T. Watanabe, T. Date, J. Miura, S. Kumaki, N. Ishii, and Y. Sakiyama. 2002. The role of common γ chain in human monocytes in vivo; evaluation from the studies of X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) carriers and X-SCID patients who underwent cord blood stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 118: 858–863.
- Spolski, R., and W. J. Leonard. 2008. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 57–79.
- Leonard, W. J., and R. Spolski. 2005. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 688–698.
- Ozaki, K., R. Spolski, R. Ettinger, H. P. Kim, G. Wang, C. F. Qi, P. Hwu, D. J. Shaffer, S. Akilesh, D. C. Roopenian, et al. 2004. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol.* 173: 5361–5371.
- Ozaki, K., R. Spolski, C. G. Feng, C. F. Qi, J. Cheng, A. Sher, H. C. Morse, III, C. Liu, P. L. Schwartzberg, and W. J. Leonard. 2002. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298: 1630–1634.
- Wang, G., M. Tschöy, 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: 9016–9022.
- Hecker, A., A. Kaufmann, M. Hecker, W. Padberg, and V. Grau. 2009. Expression of interleukin-21, interleukin-21 receptor α and related type I cytokines by intravascular graft leukocytes during acute renal allograft rejection. *Immunobiology* 214: 41–49.
- Jüngel, 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: 1468–1476.
- Akamatsu, N., Y. Yamada, H. Hasegawa, K. Makabe, R. Asano, I. Kumagai, K. Murata, Y. Imaizumi, K. Tsukasaki, K. Tsuruda, et al. 2007. High IL-21 receptor expression and apoptosis induction by IL-21 in follicular lymphoma. *Cancer Lett.* 256: 196–206.
- Gagnon, J., S. Ramanathan, C. Leblanc, and S. Ilangumaran. 2006. Regulation of IL-21 signaling by suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in CD8⁺ T lymphocytes. *Cell. Signal.* 19: 806–816.
- Agramonte-Hevia, J., C. Hallal, C. Garay-Canales, C. Guerra-Araiza, I. Camacho-Arroyo, and E. Ortega Soto. 2003. α , 25-Dihydroxy-vitamin D₃ alters Syk activation through Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *J. Cell. Biochem.* 89: 1056–1076.
- Mócsai, A., Z. Jakus, T. Vántus, G. Berton, C. A. Lowell, and E. Ligeti. 2000. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J. Immunol.* 164: 4321–4331.
- Pamuk, O. N., and G. C. Tsokos. 2010. Spleen tyrosine kinase inhibition in the treatment of autoimmune, allergic and autoinflammatory diseases. *Arthritis Res. Ther.* 12: 222.
- Ghosh, D., and G. C. Tsokos. 2010. Spleen tyrosine kinase: an Src family of non-receptor kinase has multiple functions and represents a valuable therapeutic target in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity* 43: 48–55.
- Scott, D. L. 2011. Role of spleen tyrosine kinase inhibitors in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 71: 1121–1132.
- Botti, E., G. Spallone, R. Caruso, G. Monteleone, S. Chimenti, and A. Costanzo. 2012. Psoriasis, from pathogenesis to therapeutic strategies: IL-21 as a novel potential therapeutic target. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13: 1861–1867.
- Sarra, M., and G. Monteleone. 2010. Interleukin-21: a new mediator of inflammation in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 294582.
- Yuan, F. L., W. Hu, W. G. Lu, X. Li, J. P. Li, R. S. Xu, C. W. Li, F. H. Chen, and C. Jin. 2011. Targeting interleukin-21 in rheumatoid arthritis. *Mol. Biol. Rep.* 38: 1717–1721.
- Carry, S., S. Van de Velde, F. Van Bambeke, M. P. Mingeot-Leclercq, and P. M. Tulkens. 2004. Impairment of growth of *Listeria monocytogenes* in THP-1 macrophages by granulocyte macrophage colony-stimulating factor: release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide. *J. Infect. Dis.* 189: 2101–2109.
- Byrne, P. V. 1989. Human myeloid cells possessing high-affinity receptors for granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Leuk. Res.* 13: 117–126.

49. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389–400.
50. Diaz-Silvestre, H., P. Espinosa-Cueto, A. Sanchez-Gonzalez, M. A. Esparza-Ceron, A. L. Pereira-Suarez, G. Bernal-Fernandez, C. Espitia, and R. Mancilla. 2005. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb. Pathog.* 39: 97–107.

Article 2

Titre

Mechanism involved in interleukin-21-induced phagocytosis in human monocytes and macrophages.

Auteurs

Francis Vallières et Denis Girard

Publié dans la revue

Clinical & Experimental Immunology. 2017 Feb ; 187(2) : 294-303

Contributions personnelles

J'ai effectué l'ensemble des expériences de ce papier. J'ai effectué l'ensemble de l'analyse et de l'interprétation des résultats de même que la mise en forme des figures. Finalement, j'ai participé au design expérimental et à la rédaction et correction du manuscrit.

Contributions des autres auteurs

Denis Girard a participé à la planification des expériences ainsi qu'à la rédaction du papier.

Résumé de l'article 2 en français

Mécanismes impliqués dans la phagocytose augmentée en réponse à l'IL-21 dans les monocytes et les macrophages humains

L'exploitation du système IL-21/IL-21R est une avenue prometteuse dans le développement de nouvelles thérapeutiques. Toutefois, bien que les effets biologiques de l'IL-21 de même que les voies de signalisation qu'elle active aient été largement caractérisés dans plusieurs leucocytes, ses interactions avec les monocytes et les macrophages humains ont été négligées. Nous avons précédemment montré que l'IL-21 augmente la phagocytose effectuée par l'entremise des FcRγ dans les monocytes et les macrophages dérivés des monocytes humains (MDMH) et identifié Syk comme nouvelle cible moléculaire de l'IL-21. Dans cette étude, nous approfondissons notre compréhension des mécanismes permettant à l'IL-21 d'accroître la phagocytose de ces cellules. L'IL-21 ne module pas la phagocytose d'*Escherichia coli* ni celle de particule de zymosan dans les monocytes, contrairement à ce qui est observé pour les globules rouges de moutons opsonisés (SRBC). De plus, l'augmentation de la phagocytose effectuée par l'entremise des FcRγ n'est pas le résultat d'une modulation de l'expression du CD16, du C32 et du CD64. Chez les MDMH, l'IL-21 accroît la phagocytose de zymosan. De plus, elle active p38, Akt, STAT-1 et STAT-3 dans les monocytes et les MDMH. En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, nous montrons que l'augmentation de la phagocytose par l'IL-21 est dépendante de l'activation des voies de signalisation des MAPK, de la PI3K-Akt et de celle des Jak-STAT. Ces résultats obtenus dans les monocytes et les macrophages humains devront être pris en considération dans l'optique de l'utilisation du système IL-21/IL-21R pour des fins thérapeutiques.

Mechanism involved in interleukin-21-induced phagocytosis in human monocytes and macrophages

F. Vallières and D. Girard

Laboratoire de recherche en inflammation
et physiologie des granulocytes, Université
du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier,
Laval, QC, Canada

Summary

The interleukin (IL)-21/IL-21 receptor (R) is a promising system to be exploited for the development of therapeutic strategies. Although the biological activities of IL-21 and its cell signalling events have been largely studied in immunocytes, its interaction with human monocytes and macrophages have been neglected. Previously, we reported that IL-21 enhances Fc gamma receptor (FcR γ)-mediated phagocytosis in human monocytes and in human monocyte-derived macrophages (HMDM) and identified Syk as a novel molecular target of IL-21. Here, we elucidate further how IL-21 promotes phagocytosis in these cells. Unlike its ability to enhance phagocytosis of opsonized sheep red blood cells (SRBCs), IL-21 did not promote phagocytosis of *Escherichia coli* and zymosan by monocytes and did not alter the cell surface expression of CD16, CD32 and CD64. In HMDM, IL-21 was found to enhance phagocytosis of zymosan. In addition, we found that IL-21 activates p38, protein kinase B (Akt), signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 and STAT-3 in monocytes and HMDM. Using a pharmacological approach, we demonstrate that IL-21 enhances phagocytosis by activating some mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt and Janus kinase (JAK)-STAT pathways. These results obtained in human monocytes and macrophages have to be considered for a better exploitation of the IL-21/IL-21R system for therapeutic purposes.

Keywords: cell signalling, interleukin-21, macrophages, monocytes, phagocytosis

Accepted for publication 19 October 2016
Correspondence: D. Girard, INRS-Institut
Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies,
Laval, QC H7V 1B7, Canada.
E-mail: denis.girard@iaf.inrs.ca

Introduction

Interleukin (IL) 21 is the latest member of the CD132 (γ c)-dependent cytokines that have been discovered [1,2]. This family of cytokines is also composed of IL-2, -4, -7, -9 and -15, all of which are known to play important roles in regulating immune system development and responses [3]. Upon ligation to its heterodimeric receptor, which is composed of a specific IL-21R α (CD360) chain and the shared CD132 component (or γ c), IL-21 is known to mediate its biological effects through activation of the Janus kinase (JAK) and signal transducer and activator of transcription pathway (STAT), mainly JAK1, JAK3, STAT-1, STAT-3 and, to a lesser extent, STAT-5 [2,4–6]. Some studies have reported that IL-21 could also activate mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositolide 3-kinase (PI3K) pathways [7,8]. This cytokine plays an important

role in the physiopathology of various inflammatory and autoimmune diseases. Indeed, different studies have reported that blockade of IL-21 has a therapeutic effect, as observed in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis murine models, where this approach reduced the disease severity/symptoms and increase animal survival [9–12].

The effects of IL-21 on lymphoid cell functions are well characterized. IL-21 is known to regulate T cell survival, differentiation and proliferation, B cell survival, differentiation into plasma cells and immunoglobulin (Ig) production as well as natural killer (NK) cells proliferation and cytotoxicity [13]. However, the effects of IL-21 on myeloid cells have attracted much less attention, in particular in humans. Initially, myeloid cells were not recognized as cells expressing CD360. Over time, increasing evidence indicates

that monocytes, macrophages and dendritic cells express this IL-21 receptor component [8,14], and it is only recently that primary human monocytes and human monocyte-derived macrophages (HMDM) were found to express CD360 (initially IL-21R α) at their cell surface [15]. Some functions of myeloid-origin cells were found to be modulated by IL-21. For example, stimulation of dendritic cells with IL-21 inhibits their activation and maturation [16]. IL-21 was also found to inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokine secretion [17]. Recently, it has been shown that IL-21 stimulation on conventional dendritic cells induced IL-1 β secretion by a non-canonical mechanism involving STAT-3 activation [18]. Using THP-1 cells, primary human monocytes and HMDM, we reported that IL-21 enhances Fc gamma receptor (Fc γ R)-mediated phagocytosis of opsonized sheep red blood cells (SRBCs) and that spleen tyrosine kinase (Syk) is a molecular target of IL-21 [15]. Also in macrophages, IL-21 was found to promote antigen uptake, stimulate protease activity and attenuate the cytokine secretion induced by LPS [19,20].

There is an increasing interest to develop IL-21 blockers and to exploit the IL-21/IL-21R system therapeutically in the establishment of new clinical trials [21–23]. Clearly, based on the above observations, it becomes important to understand more clearly how IL-21 can alter the biology of human monocytes and macrophages in order to achieve this goal. In this study, we demonstrate that IL-21 enhances the ability of human monocytes and HMDM to exert phagocytosis by a mechanism involving MAPKs [p38, extracellular signal regulated kinase (Erk)-1/2], PI3K/Akt and JAK/STAT pathways.

Materials and methods

Chemicals and reagents

>RPMI-1640, HEPES, penicillin/streptomycin, heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered Anti-sheep red blood cell (SRBC) antibodies and trypan blue were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Ficoll-paque was obtained from GE Healthcare Bioscience AB (Uppsala, Sweden). Cytokines [granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-21] were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) and SRBCs from Lampire Biological Laboratories (Pipersville, PA, USA). Antibodies directed against p-p38, p-Erk1/2, Erk1/2, p-Akt, p-STAT-1, STAT-1, p-STAT-3 and STAT-3 were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA). The anti-p38 and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). All secondary antibodies were purchased from Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA, USA). The JAK-2/JAK-3 STAT-1, -3, -5a and -5b inhibitor tyrphostin B42 (or AG490), MAPK/ERK inhibitor PD98059 and p38 MAPK

inhibitor SB203580 were obtained from Sigma Aldrich and the Akt inhibitor wortmannin was purchased from EMD Bioscience (San Diego, CA, USA). Mouse IgG1 isotypic control-fluorescein isothiocyanate (FITC), mouse anti-human CD16-FITC, mouse anti-human CD32-FITC and mouse anti-human CD64-FITC antibodies were all obtained from BD Biosciences (San Diego, CA, USA).

Cell culture and preparation of HMDM

THP-1 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) and were cultured in RPMI-1640 supplemented with 2.05 mM L-glutamine, 100 mM HEPES, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (referred hereafter as RPMI-1640) and 10% FBS and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C, as described previously [15]. Cells were subcultured before reaching a concentration of 8×10^5 cells/ml, as recommended by the ATCC.

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from venous blood of healthy volunteers by centrifugation over Ficoll-paque. Blood donations were obtained from informed and consenting individuals by an institutionally approved procedure. HMDM (also designated here as macrophages) were generated by incubating 4×10^6 PBMC at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 2 h in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum in 48-well plates. Monocytes obtained by removing the non-adherent PMBCs were incubated further for 7 days in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS in the presence of 2 ng/ml GM-CSF to obtain macrophages, as described previously [15]. Cell viability was determined systematically by trypan blue exclusion assay prior all experiments and was always $\geq 95\%$.

Cell surface expression of CD16, CD32 and CD64

THP-1 monocytes (1×10^6 cells/ml) were incubated with buffer or 50 ng/ml IL-21 for 30 min at 37°C, 5% CO₂. After several washes, cells (1×10^6 cells/ml) were stained with 10 μ l of FITC-conjugated anti-CD16, -CD32, -CD64 or the appropriate isotypic control antibodies for 30 min on ice. Cells were washed twice with ice-cold PBS before being resuspended at 1×10^6 cells/ml. Cell surface expression was determined immediately using a fluorescence activated cell sorter (FACS)Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). In some experiments, after the 30-min treatment with buffer or IL-21, cells were washed and then kept for an additional 60 min in the presence of culture medium only. Then, cell surface expression of CD16, CD32 and CD64 was determined as above.

THP-1 phagocytosis of *Escherichia coli*, Zymosan and opsonized SRBCs

Phagocytosis was assessed by flow cytometry using Alexa Fluor[®] 488-conjugated *E. coli* or Alexa Fluor[®] 488-conjugated zymosan bioparticles (Life Technologies, Eugene, OR, USA). To this end, cells were stimulated with buffer or 50 ng/ml IL-21 at 37°C or 4°C (as a negative technical control) for 30 min before incubation with *E. coli* or zymosan opsonized or not with serum. Cells were then centrifuged and supernatants were discarded. Bacteria or zymosan particles were diluted in HBSS and were added to THP-1 cells (10 : 1 THP-1). After 30 min, bacteria or zymosan particles that were not ingested by the cells were washed twice with PBS and removed by centrifugation onto a 4.5-ml gradient of RPMI-1640 medium containing 5% bovine serum albumin (BSA). Bacteria remaining at the surface were then removed and cells located in the pellet were quenched with trypan blue. After three washes, cells were suspended in 500 µl PBS for analysis. Cellular phagocytosis was monitored by flow cytometry at 525 nm. Phagocytosis of Alexa Fluor[®] 488-conjugated *E. coli* and Alexa Fluor[®] 488-conjugated zymosan was expressed as the percentage of FL-1-positive cells compared with cell autofluorescence.

Phagocytosis of opsonized SRBCs by THP-1 cells or macrophages

SRBCs were washed three times in ice-cold PBS and resuspended at 50×10^6 cells/ml and then opsonized with anti-SRBCs (1 : 200) (subagglutination titre) at 37°C for 45 min, as published previously [15,24]. THP-1 cells were treated with buffer or IL-21 for 30 min, as above. RPMI-1640 was removed after centrifugation and opsonized SRBC were added onto the pellet in a 5 : 1 ratio and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 1 h. After incubation with SRBCs, the samples were centrifuged at 200 g for 10 min at 4°C. Supernatants were discarded and an osmotic shock was performed on the pellets by resuspending the cells with 400 µl H₂O for 15 s, and osmolarity was then recovered by the addition of 4.5 ml of ice-cold PBS. The samples were then washed twice and the final pellets were suspended in 400 µl PBS, cytocentrifuged and stained with the Hema-3 stain set (Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ, USA). A minimum of 250 cells per condition were counted and phagocytosis was expressed as the percentage of THP-1 cells ingesting at least one opsonized SRBC. In some experiments, cells were preincubated for 30 min at 37°C with p38 inhibitor SB203580 (5 µM), mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)1/2/Erk-1/2 inhibitor PD98059 (10 µM), JAK/STAT inhibitor AG490 (30 µM) or PI3K/Akt inhibitor wortmannin (50 nM) before IL-21 stimulation. For phagocytosis by HMDM, cells were washed twice with warm HBSS and then stimulated with or without IL-21 in a final volume of 100 µl for

30 min at 37°C. These macrophages were incubated with 10×10^6 SRBCs for 15 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The plates were then removed and placed on ice for 5 min. Cells were washed once with ice-cold PBS to remove excess non-ingested SRBCs. An osmotic shock was performed by adding 100 µl ice-cold H₂O for 15 s. Osmolarity was restored by adding 1 ml ice-cold PBS. Cells were then stained with the Hema-3 stain kit and ~250 cells/condition were used to determine phagocytosis. As above, cells were preincubated for 30 min at 37°C with the indicated inhibitors prior to the IL-21 treatment.

Phagocytosis of zymosan by macrophages

Before the assay, HMDM were washed twice with warm HBSS and then stimulated with or without IL-21, as above. Macrophages were then incubated with 200 µg/ml of pHrodo green zymosan (Life Technologies) resuspended in live cell imaging solution (Life Technologies, Grand Rapid, NY, USA) for 1 h at 37°C, 5% CO₂. Cells were then washed three times with live cell imaging solution and 200 µl of ice-cold live cell imaging solution was added. Nuclei were stained with NucBlue live cell stain (Life Technologies). Phagocytosis was determined by fluorescence microscopy. In some experiments, cells were pretreated for 30 min at 37°C with different inhibitors prior to the IL-21 stimulation, as above.

Western blot experiments

Cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with buffer or IL-21 (50 ng/ml) for 0.25–60 min at 37°C. At the end of the incubation periods, the cells were lysed in Laemmli's sample buffer and aliquot corresponding to 3.5×10^5 cells were loaded onto 7.5% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes for the detection of specific protein. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS)-Tween (0.15%) containing 3% BSA. After washing, primary antibodies were added at a final dilution of 1 : 1000 in TBS-Tween 0.15%. The membranes were kept overnight at 4°C with gentle agitation, then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1 : 20 000 in TBS-Tween) followed by several washes. Protein expression was revealed using Clarity ECL substrate with ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were stripped with re-blot plus strong antibody stripping solution (Millipore, Billerica, MA, USA) and reprobed to confirm equal loading of proteins. In some experiments, cells were preincubated for 30 min at 37°C with the indicated inhibitors before the IL-21 stimulation, as above.

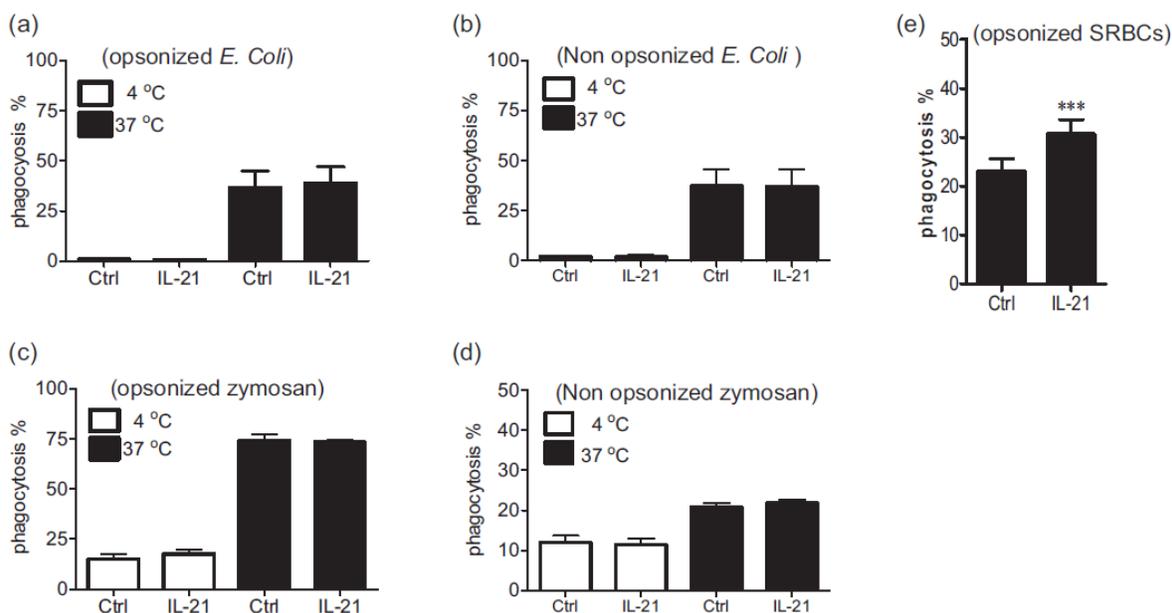


Fig. 1. Interleukin (IL)-21 does not promote phagocytosis of bacteria or zymosan opsonized or not with human serum in human monocytic THP-1 cells. THP-1 cells were treated with buffer (Ctrl) or IL-21 (50 ng/ml) for 30 min and then phagocytosis of human serum opsonized (a) or non-opsonized *Escherichia coli*, (b) serum opsonized (c) or non-opsonized zymosan (d) and opsonized sheep red blood cells (SRBCs) (e) was determined as described in Materials and methods. The assay was performed at 37°C (black bar) or 4°C (open bar). Data are means \pm standard error of the mean ($n = 4$).

Statistical analysis

Experimental data are expressed as means \pm standard error of the mean (s.e.m.). Repeated-measures analysis of variance (ANOVA) (Tukey's multiple-comparison test) or paired Student's *t*-test were performed using Graph-Pad Prism (version 5.01) as specified in the figure legend. Differences were considered statistically significant as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$ versus buffer or the appropriate diluent.

Results

IL-21 does not enhance the capacity of human monocytic THP-1 cells to phagocytose bacteria or zymosan

As we have documented previously that IL-21 enhances the Fc γ R-mediated phagocytosis of opsonized SRBSa in human THP-1 cells [15], we decided to determine first if IL-21 could increase the phagocytosis of other agents that

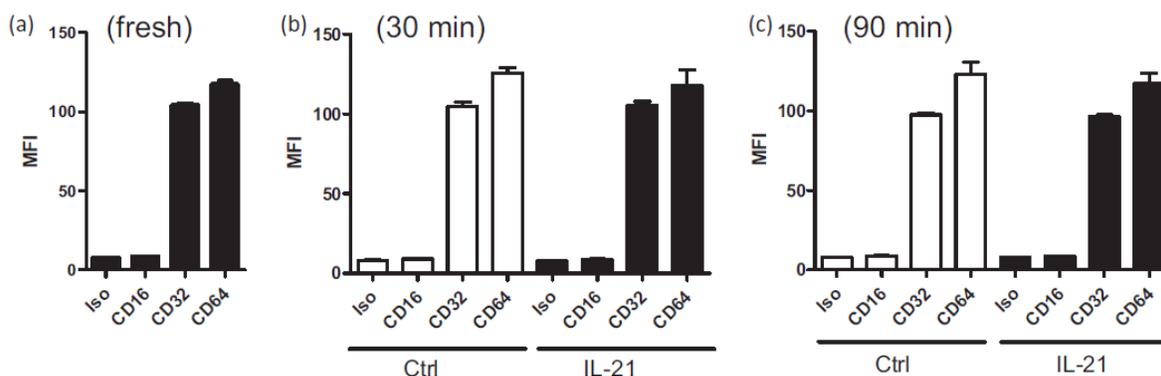


Fig. 2. Interleukin (IL)-21 does not modulate the cell surface expression of Fc gamma receptor (Fc γ) in human monocyte-like THP-1 cells. Separate batches of THP-1 cells were cultured and used to determine the cell surface expression of Fc receptors by flow cytometry using specific antibodies against CD16, CD32, CD64 and the corresponding isotypic controls (Iso), as described in Materials and methods. Cells were untreated (a), treated with buffer or IL-21 (50 ng/ml) for 30 min (b) or treated with IL-21 (50 ng/ml) for 30 min, washed and incubated for 60 min (c). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). Data are means \pm standard error of the mean ($n = 4$).

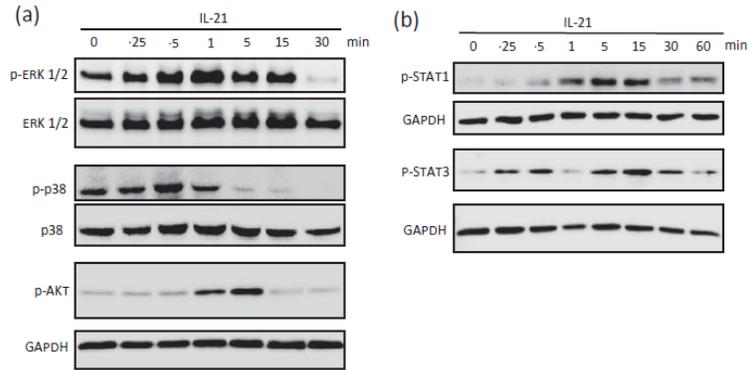


Fig. 3. Activation of signal transducer and activator of transcriptions (STATs), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and protein kinase B (Akt) in human monocyte-like THP-1 cells by IL-21. THP-1 cells were treated with buffer (Ctrl) or IL-21 (50 ng/ml) for the indicated periods of time, and activation of extracellular signal regulated kinase (Erk)-1/2, p38, Akt (a) and STAT-1 and STAT-3 (b) was determined by Western blot experiments as described in Materials and methods. Equal loading was verified after stripping and reprobing the membranes with antibodies directed against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or the corresponding non-phosphorylated form of Erk-1/2 and p38. Results are from one representative experiment of three.

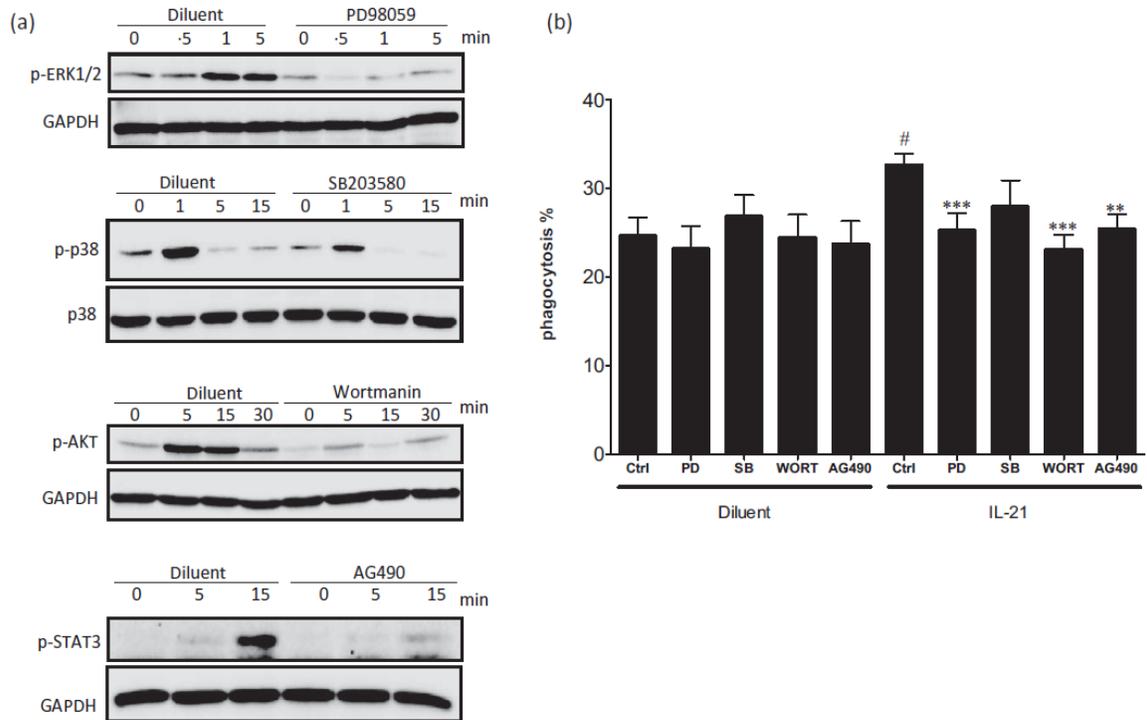


Fig. 4. Role of some mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B (PI3K/Akt) and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathways in the ability of interleukin (IL)-21 to enhance Fc gamma receptor (FcR γ)-mediated phagocytosis in THP-1 cells. (a) THP-1 cells were treated with the indicated inhibitors or corresponding diluent prior activation with IL-21 (50 ng/ml) for the indicated periods of time and activation of extracellular signal regulated kinase (Erk)-1/2, p38, Akt and STAT-3 (a) or phagocytosis (b) was performed as described in Materials and methods. (a) Results are from one representative experiment of three; (b) data are means \pm standard error of the mean ($n = 6$). # $P < 0.05$ versus diluent; ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ versus Ctrl-IL-21. PD = PD98059; SB = SB203580; Wort = wortmannin; AG = AG490.

could also involve complement components. As illustrated in Fig. 1, IL-21 did not increase the basal level of phagocytosis of serum-opsonized or non-opsonized *E. coli* (Fig. 1a,b, respectively) as well as serum-opsonized or non-opsonized zymosan (Fig. 1c,d), respectively. However, cells were responsive to IL-21 because, as expected [15], the cytokine treatment enhances the basal level of phagocytosis of opsonized SRBCs from $23 \pm 2.6\%$ (mean \pm s.e.m., $n = 8$) to $30.7 \pm 2.9\%$ (Fig. 1e).

IL-21 does not modulate the cell surface expression of Fc γ R in human monocytes

Although we have reported previously that IL-21 enhances the phagocytosis of opsonized SRBCs in human monocytes and macrophages by a Syk-dependent mechanism [15], the mode of action of IL-21 is still unclear. Therefore, we determined next whether or not IL-21 could modulate the cell surface expression of Fc γ R in THP-1 monocytes and, as illustrated in Fig. 2, IL-21 did not alter the expression of CD16, CD32 or CD64.

Cell signalling events induced by IL-21

The cell signalling events induced by IL-21 in human monocytes is documented poorly. As we have demonstrated previously that IL-21 can activate Erk-1/2 in THP-1 cells [15], we then decided to investigate further the cell signalling events induced by IL-21. As illustrated in Fig. 3a, in addition to Erk/1-2 (used here as a positive control), IL-21 activates p38 and Akt rapidly within 5 min of stimulation. Also, we found that IL-21 can activate STAT-1 and STAT-3 (Fig. 4b).

IL-21 enhances phagocytosis by a mechanism involving activation of Erk-1/2, Akt and STATs but not p38 in human monocytes

Next, we performed experiments in order to determine the role of several intracellular proteins activated by IL-21 in Fc γ R-mediated phagocytosis. First, we tested the ability of different pharmacological inhibitors to reverse the ability of IL-21 to induce tyrosine phosphorylation of a given protein. As illustrated in Fig. 4a, pretreatment of cells with the corresponding diluent, PD98059 (MEK1/MEK2 and Erk-1/2 sensitive inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), wortmannin (PI3K/Akt inhibitor) and AG490 (JAK/STAT inhibitor) indicates that all inhibitors are able to reverse the activation/phosphorylation of the tested proteins; namely, Erk-1/2, p38, Akt and STAT-3. Next, we used these inhibitors to determine if they can reverse the ability of IL-21 to enhance Fc γ R-mediated phagocytosis. As illustrated in Fig. 4b, all inhibitors but SB203580 were able to decrease significantly the percentage of phagocytosis at values close to the basal level.

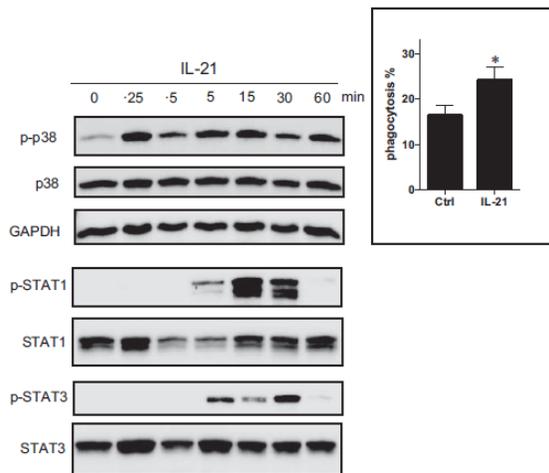


Fig. 5. Interleukin (IL)-21 activates p38, signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 and STAT-3 in human macrophages. Macrophages were treated with buffer (Ctrl) or IL-21 (50 ng/ml) for the indicated periods of time and activation of p38, STAT-1 and STAT-3 was determined by Western blot experiments as described in Materials and methods. Inset, the ability of IL-21 to enhance Fc gamma receptor (Fc γ)-mediated phagocytosis was performed in parallel as described in Materials and methods. Results are from one representative experiment of at least three. Inset = results are means \pm standard error of the mean ($n = 6$).

IL-21 activates STATs in human monocyte-derived macrophages

We have reported previously that IL-21 activates Erk-1/2 in HMDM [15]. Because of the present results indicating that IL-21 can activate other MAPKs and STAT-1 and STAT-3 in human THP-1 monocytes, we then performed experiments in order to determine if this is also observed in GM-CSF-derived HMDM. As illustrated in Fig. 5, IL-21 induces a very rapid tyrosine phosphorylation of p38 (within 15 s) in macrophages. Also, this cytokine activates both STAT-1 and STAT-3 after \sim 5 min of stimulation in these cells, which disappears after \sim 60 min. As expected [15], macrophages were fully responsive to IL-21, as evidenced by its ability to enhance phagocytosis of opsonized SRBCs (inset).

IL-21 enhances phagocytosis in HMDM by a MAPK- and STAT-dependent mechanism

Fig. 6a illustrates that, as for THP-1 monocytes, the tested inhibitors also reversed the phosphorylation of MAPKs, STAT-1 and STAT-3 in HMDM. In addition, all these inhibitors, with the exception of PD98059, were able to decrease IL-21-induced phagocytosis, indicating that the weak to moderate phosphorylation of Erk-1/2 is not involved in this process (Fig. 6b).

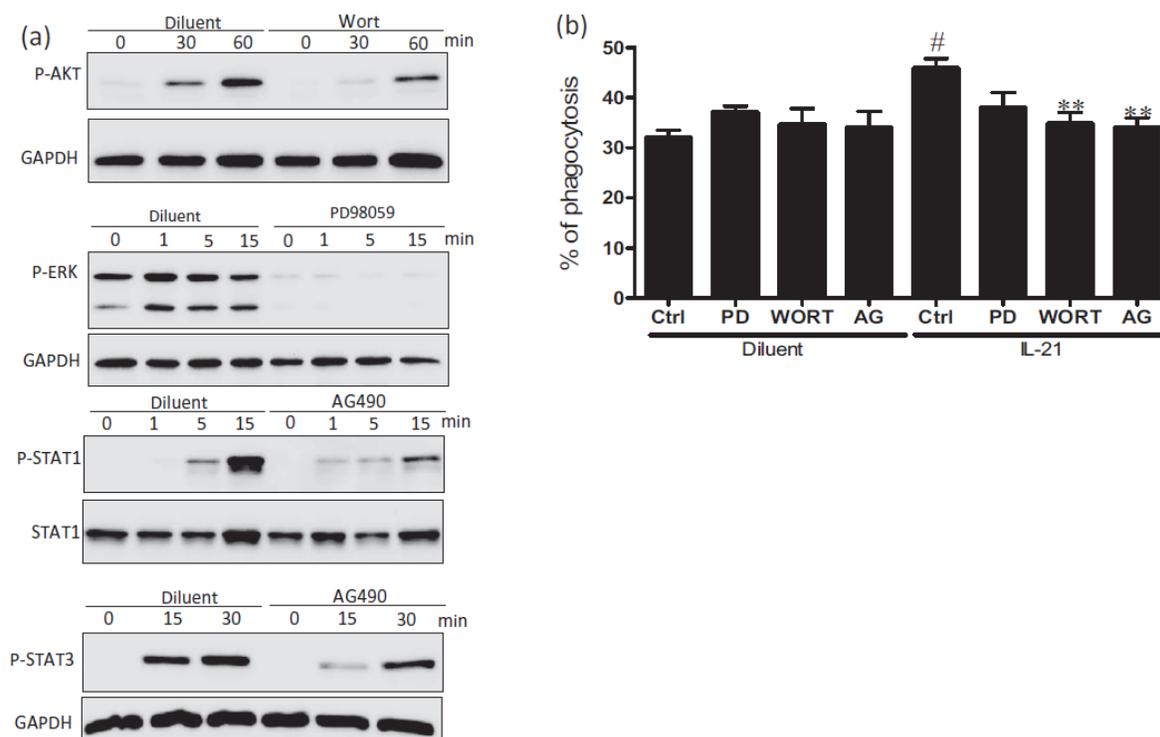


Fig. 6. Cell signalling events involved in interleukin (IL)-21-induced enhancement of Fc gamma receptor (FcR γ)-mediated phagocytosis in human macrophages. Macrophages were treated with the indicated inhibitors or corresponding diluent prior to activation with IL-21 for the indicated periods of time and activation of protein kinase 3 (Akt), extracellular signal regulated kinase (Erk)-1/2, signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 and STAT-3 (a) or phagocytosis (b) was performed as described in Materials and methods. (a) Results are from one representative experiment of three; (b) data are means \pm standard error of the mean ($n = 4$). [#] $P < 0.05$ versus diluent; ^{**} $P < 0.01$ or ^{***} $P < 0.001$ versus corresponding diluent. PD = PD98059; AG = AG490; Wort = wortmannin.

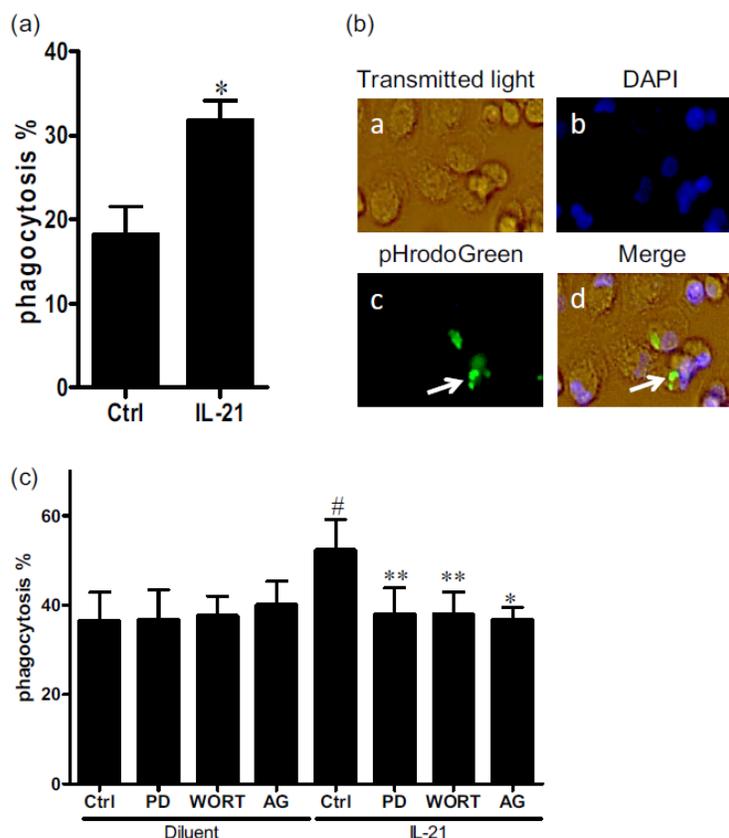
The capacity of human macrophages to phagocytose zymosan is enhanced by IL-21 via a MAPK-, PI3K/ Akt- and JAK/STAT-dependent mechanism

Unlike THP-1 cells, HMDM are extremely adherent during culture conditions, and instead of harvesting them by a drastic procedure in order to determine phagocytosis by FACS, we adopted another strategy based on the use of the pHrodo green zymosan bioparticles conjugate for phagocytosis that are pH-sensitive and non-fluorescent extracellularly but fluoresce brightly inside cells, in the phagosomes (green spots in Fig. 7b). As illustrated in Fig. 7a, IL-21 enhances significantly the basal level of zymosan phagocytosis from $18.1 \pm 3.4\%$ to $31.7 \pm 2.4\%$ (mean \pm s.e.m., $n = 3$). In one other cohort of experiments, we next used the pharmacological inhibitors to determine if IL-21 also acts by different intracellular pathways under these experimental conditions. As illustrated in Fig. 7c, all the tested inhibitors decreased the capacity of IL-21 to enhance zymosan phagocytosis, indicating the role of MAPKs, PI-3K/Akt and STATs in human macrophages.

Discussion

In most of the review papers published on IL-21 [22,23,25–27], only two major observations regarding its biological activity in monocytes–macrophages are reported: IL-21 enhances phagocytosis and IL-8 production. These observations originate from a few papers: one where treatment with IL-21 in murine bone marrow-derived macrophages was found to increase FITC-dextran uptake [19]; one other where we found that IL-21 enhances the phagocytosis of opsonized SRBCs in THP-1 cells, primary human monocytes and HMDM [15]; one where the production of IL-8 by human monocytes was increased by IL-21 [28]; and finally, one where we reported that IL-21 induces IL-8 production in human macrophages [8]. Of note, even recently, other excellent reviews simply ignore the fact that monocytes and macrophages are targets of IL-21. Therefore, even if the IL-21/IL21R system is attractive to be exploited for the development of therapeutic strategies [9,21,22,29–31], there is currently a serious lack of information regarding how this system operates in human monocytes and macrophages. Herein, we demonstrate that

Fig. 7. Involvement of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphoinositide 3-kinase–protein kinase B (PI3K/Akt) and Janus kinase–signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathways in the ability of interleukin (IL)-21 to enhance phagocytosis of zymosan in human macrophages. (a) Macrophages were treated with buffer (Ctrl) or IL-21 (50 ng/ml) for 30 min before being incubated with 200 µg/ml of pHrodo green zymosan bioparticles for 1 h and phagocytosis was determined as described in Materials and methods; (b) representative microphotographs of the pHrodo green zymosan bioparticle phagocytosis assay; (c) macrophages were pretreated for 30 min with the indicated inhibitors prior to activation with buffer or IL-21 for 30 min and phagocytosis was then determined. (a) Results are means ± standard error of the mean ($n = 3$); (c) results are means ± standard error of the mean ($n = 4$). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



IL-21 does not enhance phagocytosis of *E. coli* and zymosan by human monocytes, even in the presence of human serum, leading to the observation that, as yet, this cytokine increases FcR γ -mediated phagocytosis of SRBCs only in human monocytes, as ovine erythrocytes were opsonized specifically here with anti-SRBC antibodies. This suggests that even if Syk is activated in these cells [15], the downstream events involved in these types of phagocytosis are not activated efficiently. However, we reported that IL-21 does not alter the cell surface expression of the FcR γ CD16, CD32 and CD64 in monocytes directly after 30 min of stimulation with IL-21 or when cells were kept 1 h after their activation. To the best of our knowledge, this is the first time that the expression of these receptors has been studied in IL-21-treated human monocytes. However, in one study, IL-21 was found to maintain the expression of CD16 on monocytes, but this was observed in an experimental condition requiring the presence of IL-10 in the supernatants from CD3/CD28/IL-21-activated T cells, and this was determined after 24 h of culture [32].

Even if the cell signalling events and the roles of IL-21 are well established in most of the immune cell types, in particular in lymphoid B, T and NK cells [21,33–36], this is not the case for human monocytes and macrophages.

Therefore, the results of this present study, demonstrating that IL-21 enhance phagocytosis in human monocytes and HMDM by a mechanism requiring activation of several cell signalling molecules, are novel observations, increasing our general knowledge on the mode of action of IL-21. Indeed, in addition to Syk [15] and Erk-1/2 [15,28], we determined here that p38, Akt, STAT-1 and STAT-3 are new molecular targets of IL-21 in these cells.

In our previous study, we reported that IL-21 can enhance phagocytosis of opsonized SRBCs in THP-1, primary monocytes and HMDM [15]. In this study we found that IL-21 can enhance phagocytosis of zymosan by HMDM, but not by THP-1 cells. It is interesting to note that, in one other study, we reported previously that IL-21 can increase the production of IL-8 by HMDM, but not by primary monocytes [8], suggesting that mature differentiated cells are more responsive to IL-21. However, and in contrast to our results, only one study reported that IL-21 was able to increase the IL-8 production by primary human monocytes [28]. Monocytes were plated at very high cell density (30×10^6 cells/ml versus 1×10^6 cells/ml in our experimental conditions), and the basal level of secreted IL-8 was not monitored over time in corresponding untreated cells.

Also in this study we report that IL-21, in contrast to monocytes, enhance the ability of HMDM to phagocytose zymosan, again suggesting that mature differentiated cells are more responsive to IL-21. In general, the yeast cell wall component zymosan is known to bind to Toll-like receptor (TLR)-2 during inflammatory responses whereas phagocytosis of zymosan, as performed here, is known to involve different receptors that could recognize the same or different of its components. For example, receptors to sugars (in particular mannose receptors) are known to be involved and to lead to zymosan uptake/internalization/phagocytosis by phagocytes, including macrophages [37,38]. However, as human monocytes such as THP-1 cells do not express the mannose receptor [39], it is tempting to speculate that IL-21 enhances the phagocytosis of zymosan in HMDM by altering the expression of the mannose receptors and/or the subsequent intracellular signalling events. Interestingly, pharmacological inhibition of PI3K/Akt was found previously to block non-opsonized zymosan by macrophages [39]. Thus, our present results support this further, as in addition to activation of Akt by IL-21, we also demonstrate that wortmannin (known to inhibit PI3K/Akt) blocks IL-21-induced phagocytosis of not only opsonized SRBCs but also that of non-opsonized zymosan in HMDM. Nevertheless, we are aware that several other receptors/components may be involved and that several experiments need to be performed to determine fully the mode of action of IL-21 during human macrophage phagocytosis of opsonized (SRBCs) and non-opsonised (zymosan) particles.

In addition to the very few previous studies reporting that IL-21 enhance phagocytosis in rodents [19] or human monocytes and macrophages [15], our present data demonstrating that IL-21 activates different cell signalling events in human monocytes and macrophages, including MAPKs, PI3K/Akt and JAK-STAT, provide new mechanistic insights into IL-21. In addition, our data indicate that the modulatory activity of IL-21 in human monocytes and macrophages is complex and may have relevance in the development of new or ongoing therapies, in particular for the use of IL-21 blockers. As we have used GM-CSF-induced monocyte differentiation into macrophages in this study, it will be interesting in future to determine if IL-21 will use these same cell signalling pathways when macrophages will be derived from M-CSF-induced monocytes having certain phenotypical differences.

Disclosure

The authors declare no commercial or financial conflicts of interest.

Author contributions

The conception and design of the study was by D. G.; F. V. performed all the experiments. The analysis and

interpretation of data was performed by F. V. and D.G.; D. G. and F. V. wrote the paper.

References

- 1 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.
- 2 Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR, Leonard WJ. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor β chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:11439–44.
- 3 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.
- 4 Asao H, Okuyama C, Kumaki S *et al*. Cutting edge: the common γ -chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 2001; **167**:1–5.
- 5 Habib T, Senadheera S, Weinberg K, Kaushansky K. 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* 2002; **41**:8725–31.
- 6 Zhou L, Ivanov IL, Spolski R *et al*. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; **8**:967–74.
- 7 Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE, Leonard WJ. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood* 2007; **109**:4135–42.
- 8 Pelletier M, Bouchard A, Girard D. *In vivo* and *in vitro* roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* 2004; **173**:7521–30.
- 9 Bubier JA, Sproule TJ, Foreman O *et al*. A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**:1518–23.
- 10 Herber D, Brown TP, Liang S, Young DA, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J Immunol* 2007; **178**:3822–30.
- 11 Young DA, Hegen M, Ma HLM *et al*. Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; **56**:1152–63.
- 12 Ryu JG, Lee J, Kim EK *et al*. Treatment of IL-21R-Fc control autoimmune arthritis via suppression of STAT3 signal pathway mediated regulation of the Th17/Treg balance and plasma B cells. *Immunol Lett* 2015; **163**:143–50.
- 13 Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2014; **13**:379–95.
- 14 Jungel A, Distler JHW, Kurowska-Stolarska M *et al*. Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**:1468–76.
- 15 Vallieres F, Girard D. IL-21 enhances phagocytosis in mononuclear phagocyte cells: identification of spleen tyrosine kinase as a novel molecular target of IL-21. *J Immunol* 2013; **190**:2904–12.
- 16 Brandt K, Bulfone-Paus S, Foster DC, Rückert R. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 2003; **102**:4090–8.

- 17 Strengell M, Lehtonen A, Matikainen S, Julkunen I. IL-21 enhances SOCS gene expression and inhibits LPS-induced cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukocyte Biol* 2006; **79**:1279–85.
- 18 Wan CK, Li P, Spolski R *et al*. IL-21-mediated non-canonical pathway for IL-1 β production in conventional dendritic cells. *Nat Commun* 2015; **6**:7988.
- 19 Rückert R, Bulfone-Paus S, Brandt K. Interleukin-21 stimulates antigen uptake, protease activity, survival and induction of CD4+ T cell proliferation by murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 2008; **151**:487–95.
- 20 Li SN, Wang W, Fu SP *et al*. IL-21 modulates release of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Mediators Inflamm* 2013; **2013**: 548073.
- 21 Al-Chami E, Tormo A, Khodayarian F, Rafei M. Therapeutic utility of the newly discovered properties of interleukin-21. *Cytokine* 2015; **82**:33–7.
- 22 Gharibi T, Majidi J, Kazemi T, Dehghanzadeh R, Motalebnezhad M, Babaloo Z. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology* 2016; **221**:357–67.
- 23 Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008; **26**:57–79.
- 24 Simard J-C, Simon M-M, Tessier PA, Girard D. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol* 2011; **186**:3622–31.
- 25 Leonard WJ, Wan CK. IL-21 Signaling in immunity. *F1000Research* 2016; **5**.
- 26 Davis MR, Zhu Z, Hansen DM, Bai Q, Fang Y. The role of IL-21 in immunity and cancer. *Cancer Lett* 2015; **358**:107–14.
- 27 Pelletier M, Girard D. Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation. *ScientificWorldJournal* 2007; **7**: 1715–35.
- 28 Fuqua CF, Akomeah R, Price JO, Adunyah SE. Involvement of ERK-1/2 in IL-21-induced cytokine production in leukemia cells and human monocytes. *Cytokine* 2008; **44**:101–7.
- 29 Andersson AK, Feldmann M, Brennan FM. Neutralizing IL-21 and IL-15 inhibits pro-inflammatory cytokine production in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2008; **68**:103–11.
- 30 Botti E, Spallone G, Caruso R, Monteleone G, Chimenti S, Costanzo A. Psoriasis, from pathogenesis to therapeutic strategies: IL-21 as a novel potential therapeutic target. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; **17**:17.
- 31 Sarra M, Franze E, Pallone F, Monteleone G. Targeting interleukin-21 in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2011; **15**:695–702.
- 32 Liu Y, Yang B, Ma J *et al*. Interleukin-21 maintains the expression of CD16 on monocytes via the production of IL-10 by human naive CD4+ T cells. *Cell Immunol* 2011; **267**:102–8.
- 33 Avery DT, Ma CS, Bryant VL *et al*. STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood* 2008; **112**:1784–93.
- 34 Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 2004; **172**:2048–58.
- 35 Collins M, Whitters MJ, Young DA. IL-21 and IL-21 receptor: a new cytokine pathway modulates innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 2003; **28**:131–40.
- 36 Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 2007; **282**:34605–10.
- 37 Mukherjee S, Karmakar S, Babu SP. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Braz J Infect Dis* 2016; **20**:193–204.
- 38 Basto AP, Leitao A. Targeting TLR2 for vaccine development. *J Immunol Res* 2014; **2014**:619410.
- 39 Vigerust DJ, Vick S, Shepherd VL. Characterization of functional mannose receptor in a continuous hybridoma cell line. *BMC Immunol* 2012; **13**:51.

Article 3

Titre

Biological activities of interleukin (IL)-21 in human monocytes and macrophages.

Auteurs

Francis Vallières et Denis Girard

Soumis dans la revue

Cellular immunology le 7 novembre 2017

Contributions personnelles

J'ai effectué l'ensemble des expériences de ce papier. J'ai effectué l'ensemble de l'analyse et de l'interprétation des résultats de même que la mise en forme des figures. Finalement, j'ai conçu le design expérimental et rédigé le manuscrit.

Contributions des autres auteurs

Denis Girard a participé à la planification des expériences ainsi qu'à la rédaction du papier.

Résumé de l'article 3 en français

Activité biologique de l'interleukine (IL)-21 dans les monocytes et macrophages humains.

Malgré que les rôles biologiques de l'IL-21 aient été étudiés dans plusieurs types de leucocytes humains, les monocytes et les macrophages font toujours office de cellules négligées. Toutefois, nous avons récemment rapporté que l'IL-21 augmente la capacité de ces cellules à exercer la phagocytose, en plus d'identifier Syk comme une nouvelle cible moléculaire de l'IL-21. L'objectif de cette étude était de poursuivre l'investigation des interactions entre l'IL-21 et les monocytes et les macrophages dérivés des monocytes humains. Nos résultats montrent que l'IL-21 n'est pas un agent chimioattractant des monocytes, mais elle peut accroître leur capacité à adhérer à un substrat cellulaire sans moduler l'expression de surface de différentes molécules d'adhésion telles que CD18, CD29, CD49D, CD11a, CD11b, ICAM-1, ICAM-3 et CD62L. En utilisant un panel d'inhibiteur pharmacologique, nous avons montré que l'activation de Syk était nécessaire dans la capacité de l'IL-21 à augmenter l'adhésion cellulaire. Contrairement à ce que l'on a observé dans les monocytes, l'IL-21 accroît l'activité et la sécrétion de la métalloprotéinase-9 dans les MDMH, tel que démontré par zymographie et immunobuvardage de type western, respectivement. En utilisant la quantification par ELISA, cette étude montre que l'IL-21 n'a pas entraîné la sécrétion d'IL-6, de MIP-1 α et GRO- α dans les MDMH ni celle de ces médiateurs solubles en réponse au LPS. Nous concluons donc que l'IL-21 possède d'autres activités biologiques que sa capacité à accroître la phagocytose dans les monocytes et les macrophages humains. Finalement, nous concluons également que cette cytokine ne possède pas un large spectre d'activité biologique dans ces cellules myéloïdes humaines.

Biological activities of interleukin (IL)-21 in human monocytes and macrophages.

Francis Vallières and Denis Girard D¹

Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, Université du Québec,
INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

¹Corresponding author:

Denis Girard

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

E-mail : denis.girard@iaf.inrs.ca

Phone: (450) 687-5010 (x-8847); fax: (450) 686-5309

ABSTRACT

Although the biological roles of interleukin (IL)-21 have been studied in several types of human immune cells, monocytes and macrophages are among the most neglected ones. However, we recently reported that IL-21 increases the capacity of these cells to exert phagocytosis and that Syk is a new molecular target of IL-21. The aim of this study was to pursue investigating the interaction between IL-21 and human monocyte-derived macrophages (MDMH). We found that IL-21 is not chemoattractant for monocytes but can increase their capacity to adhere onto a cell substratum without altering the cell surface expression of CD18, CD29, CD49D, CD11a, CD11b, ICAM-1, ICAM-3 and CD62L. However, using a panel of pharmacological inhibitors, we found that Syk is very important in the capacity of IL-21 to induce cell adhesion. Unlike in monocytes, IL-21 was found to increase metalloproteinase (MMP)-9 secretion and activity in MDMH, as assessed by western blot and zymography experiments, respectively. As assessed by ELISA, we reported here that IL-21 did not increase the production of the IL-6 cytokine and the MIP-1 α and GRO- α chemokines in MDMH as well as it did not alter the LPS-induced production of these soluble mediators. We conclude that IL-21 possesses other biological activities than its capacity to increase phagocytosis by human monocytes and macrophages but we also conclude that this cytokine does not have a large spectrum of biological activities in these human myeloid cells.

Keywords: Interleukin-21; monocytes; macrophages; cellular functions

1. INTRODUCTION

Interleukin (IL) -21 is the most recent identified member of the CD132 or γ c user cytokines (Asao *et al.*, 2001, Ozaki *et al.*, 2000, Parrish-Novak *et al.*, 2000). It is mainly produced by activated T and NKT cells and plays a crucial role in the regulation of immune functions (Spolski *et al.*, 2014). Its receptor is composed of a specific alpha chain (IL-21R α or CD360) and the common γ chain (γ c or CD132) shared by receptors to IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 and IL-15. The binding of IL-21 to its receptor, leads to the activation of several signaling pathways, including, Janus kinase (JAK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways (Asao *et al.*, 2001, Habib *et al.*, 2002, Ozaki *et al.*, 2000, Stathopoulos, Zhou *et al.*, 2007), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway (Pelletier *et al.*, 2004a, Zeng *et al.*, 2007). IL-21 has a pleiotropic effect on several cell types as it can mediate T cell survival, their differentiation and proliferation, promote the maturation of B cells into plasma cells and immunoglobulin (Ig) producing cells, and regulate NK cell proliferation and cytotoxicity (Spolski *et al.*, 2014). More recently, few studies demonstrate that IL-21 could also affect the biology of cells of myeloid origin. For example, IL-21 possesses inhibiting activities on bone marrow derived dendritic cells since it can reduce their activation, maturation and reverse the cytokine production induced by LPS stimulation (Brandt *et al.*, 2003a, Brandt *et al.*, 2003c). In contrast, one other study reported that IL-21 induced IL-1 β in conventional DC that was partially regulated by STAT3 activation (Wan *et al.*, 2015). Thus, IL-21-induced responses can vary between similar cell types, underlining the needs for better understanding its effect among all different types of cells. In this respect, the role of IL-21 on monocytes and macrophages has been less studied. We are among the few teams investigating in this area and we have demonstrated that IL-21 enhances the ability of primary human monocytes and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)-derived macrophages to exert phagocytosis and that spleen tyrosine kinase (Syk) is a new intracellular molecular target of IL-21 (Vallières *et al.*, 2017, Vallières *et al.*, 2013).

IL-21 is involved in the development of several inflammatory and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and inflammatory bowel diseases (Bubier *et al.*, 2009, Herber *et al.*, 2007, Ryu *et al.*, 2015, Young *et al.*, 2007). Despite the fact that the role of IL-21 in inflammatory diseases was evidenced by the utilization of a blocking IL-21R.Fc fusion protein where the severity and symptoms were diminished, the exact mode of action is still not

clear. In one study, IL-21 was found to induce migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes (FLS) from rheumatoid arthritis (RA) patients as well as metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 secretion via PI3K/Akt, STAT and MAPK pathways, leading to bone and cartilage deterioration (Xing *et al.*, 2016). In one other study, IL-21 was found to induce MMP-1,-2, -3 and -9 expression and activity in fibroblasts from Crohn's disease patients (Monteleone *et al.*, 2006) and MMP-2 and -9 *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa (Caruso *et al.*, 2007a). Also, both invasion and migration of cancerous MDA-231 cells were promoted by IL-21 (Wang *et al.*, 2015). Monocytes and macrophages are known to express a functional IL-21R and knowing the importance of MMPs in disease progression, we investigate here if IL-21 could alter function others than phagocytosis, including MMP secretion/activity in these cells.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents.

RPMI 1640, HEPES, penicillin/streptomycin, heat inactivated fetal bovine serum (FBS) and Hank's balance salt solution (HBSS) were purchased from Life technologies (Grand Island, NY, USA). Ficoll-paque was obtained from GE healthcare Bio-science AB (Uppsala, Sweden). Trypan blue, the JAK-2/JAK-3, STAT-1, -3, -5a and -5b inhibitor tyrphostin B42 (or AG490), MAPK/ERK inhibitor PD98059 and p38 MAPK inhibitor SB203580 were obtained from Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA) and the Akt inhibitor wortmannin and Syk inhibitor II were purchased from EMD Biosciences (San Diego, CA, USA). Calcein-AM was from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Cytokines (GM-CSF and IL-21) were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Antibodies against CD11a, CD11b, CD29, CD62L, ICAM-3 and GAPDH were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-CD18, -CD49d and – ICAM-1 were from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Antibodies against MMP-2 and MMP-9 were bought from (Abcam, Cambridge, UK). Ultrapure LPS from *Salmonella* spp. was purchased from InvivoGen (San Diego, CA). All secondary antibodies came from Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA).

2.2. Cell culture conditions and preparation of human macrophages.

2.2.1. THP-1 cell culture.

THP-1 cells (ATCC[®] TIB-202[™]) were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA), and culture in RPMI 1640 supplemented with 2.05 mM L-Glutamine, 100 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (further referred to as RPMI 1640) and 10% FBS and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were subculture before reaching

a concentration of 8×10^5 cells/ml as recommended by ATCC. Cell viability was systematically evaluated by trypan blue exclusion assay before and after each treatment, and mortality never exceeded 5%.

2.2.2. EA.hy926 cell culture.

The human umbilical vein cell line EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) was purchased from ATCC and was grown in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS as we previously documented (Murphy-Marion *et al.*, 2017) . Cell viability was systematically evaluated before and after each treatment, and mortality never exceeded 5%.

2.2.3. Human macrophages.

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from venous blood of healthy volunteers by centrifugation over Ficoll-paque. Blood donations were obtained from informed and consenting individuals by an institutionally approved procedure. Human monocyte-derived macrophages (MDMH) were generated by incubating 4×10^6 PBMC at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 2h in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated autologous human serum in 48-well plates. Monocytes obtained by removing the non-adherent PMBC were further incubated for 7 days in RPMI- 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS + 2 ng/ml GM-CSF to obtain macrophages as previously described (Vallières *et al.*, 2013). In all experiments, cell viability was assessed by trypan blue exclusion prior to experiments and mortality never exceeded 5%.

2.3. Adherence assay.

Human monocyte-like THP-1 cells were treated with the diluent or with IL-21 (50 ng/ml) for 30 min, labeled for 30 min with 5 mM calcein-AM and coculture onto confluent EA.hy926 endothelial for 1h. Wells were rinsed five times with HBSS and adhesion of THP-1 cells was determined by observation with a Leica DMIL photomicroscope equipped with an ebq 100 dc epifluorescent condenser. Images were taken with a Canon Eos. Results were obtained by counting five representative fields using Image J cell counter. In some experiments, THP-1 cells were pretreated with inhibitors to MAPK/ERK (PD98059, 10 µM), MAPK p38 (SB203580, 5 µM), Jak/STAT (AG490, 30 µM), PI3K/Akt (wortmannin, 50 nM), or Syk (Syk inhibitor II, 1 mM) for 30 min prior to the adherence assay.

2.4. Assessment of adhesion molecule expression by flow cytometry

THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) was incubated in PBS-20% human serum to block Fc site. After several washes, cells were stained with 10 μ l of FITC-conjugated anti-CD11a, -CD11b, -CD62L, ICAM3 or PE-conjugated anti-CD18, -CD29, -CD49d or the appropriate isotypic control antibodies for 30 min on ice. Cells were washed twice with ice-cold PBS before being resuspended at 1×10^6 cells/ml. Cell surface expression was determined immediately using fluorescence activated cell sorter (FACS)Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). In some experiments, cells were treated for 30 min with the diluent or IL-21 (50ng/ml) and cells were marked as above.

2.5. Human monocyte-like THP-1 chemotaxis assay.

In vitro chemotaxis was performed in a 48-well microchemotaxis chamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD) using a 5 μ m polycarbonate membrane filter as previously described (Ratthe *et al.*, 2002) . Briefly, the bottom wells were loaded with diluent, increasing doses of IL-21 (5-500 ng/ml) or LPS (100 ng/ml). The membrane was then placed over the wells, and the top layer of the chamber was finally added over the membrane. 5×10^4 Cells (50 μ l from a 1×10^6 cells/ml in RPMI-1640 suspension) were added to the top chamber wells and was incubated at 37°C for 60 min in a humidified incubator in 5% CO₂ atmosphere. After the incubation, the top of the chamber was removed and the upper side of the membrane was carefully wiped with the rubber scraper provided by the manufacturer. Finally, the membrane was stained with Hema-3 Stain staining kit according to the manufacturer's instruction and mounted on a glass slide, and examined under a microscope 400X. The number of cells in 10 representative fields was counted and the results were expressed as the absolute number of cells.

2.6. Zymography.

THP-1 cells or MDMH were treated as indicated in the figure legend for 24 h and the samples were then centrifuged at 2000 rpm for 10 min at 4 C. The supernatants (10 μ l) were then mixed with non-reducing buffer (40% glycerol, 1 M Tris-HCl [pH 6.8], 8% sodium dodecyl sulfate [SDS]) and resolved over a 7.5% acrylamide gel containing 0.2% gelatin. The gel was then washed for 30 min twice with 2.5% Triton X-100 in water and incubated overnight in enzymatic digestion buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂). Thereafter, the gels were stained with 0.1% Coomassie blue solution and de-stained to determine the gelatinase activity, i.e. visualized by the apparition of white zones in blue-stained gel.

2.7. Western blotting experiments

Pellets from cells treated for zymography were lysed in Laemmli's sample buffer and resolved onto 7.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes for the detection of specific protein as indicated in the figure. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS)-Tween (0.15%) containing 3% BSA. After washing, primary antibodies were added at a final dilution of 1:1000 in TBS-Tween. The membranes were kept overnight at 4°C with gentle agitation, then washed with TBS-Tween and incubated for 1h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:20 000 in TBS-Tween) followed by several washes. Protein expression was revealed using Clarity ECL substrate with ChemiDoc MP imaging systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were stripped with reblot plus strong antibody stripping solution (Millipore, Billerica, MA, USA) and reprobod to confirm equal loading of proteins.

2.8. Production of cytokines/chemokines by human macrophages.

MDMH were rinsed twice with warm HBSS and then incubated with diluent, LPS (100 ng/ml), IL-21 (50 ng/ml) or LPS + IL-21 in RPMI 1640 medium-10% heat-inactivated FBS, for 24h in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The supernatants were then collected and centrifuged at 13000 g for 10 min at 4 °C and then stored at -80 °C for. The concentration of IL-6, MIP-1 α and GRO- α released in the external milieu were quantified using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions (IL-6 and MIP-1 α from Life Technologies, Frederick (MD) and Gro- α from R&D Systems, Minneapolis (MN)).

Statistical analysis.

The data are reported as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA (repeated measures ANOVA) and differences of each group vs. control groups were assessed by the Dunnett or Tukey's post-test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was established at *, $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. IL-21 does not induce migration of monocyte-like THP-1 cells.

As monocyte recruitment to an inflame site is a major step for establishing inflammation and, since IL-21 possesses the capacity to induce migration (Wang *et al.*, 2015, Xing *et al.*, 2016), we asked whether or not IL-21 would induce migration in THP-1 cells. As illustrated in **Fig. 1**, IL-21 does not induce chemotaxis at various tested concentrations ranging ranging from 5-500 ng/ml. In contrast, and, as expected, LPS (100 ng/ml) induced chemotaxis by a factor of ~3.

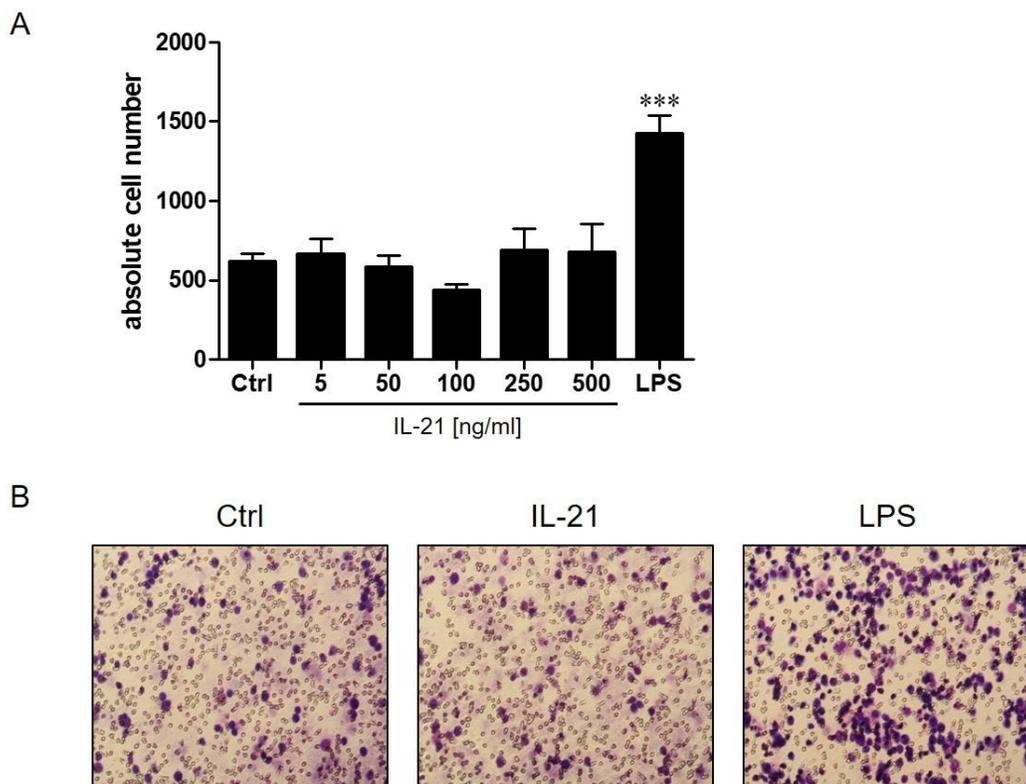


Figure 1. IL-21 is not chemoattractant for human monocytes. THP-1 cells were incubated with diluent (Ctrl), the positive control LPS (100 ng/ml) or the indicated concentrations of IL-21 in an *in vitro* chemotaxis chamber and chemotaxis was determined as described under Materials and Methods. A, results are expressed as absolute count number and represented means \pm SEM (n= 3). B, microphotograph of a representative field for Ctrl, IL-21 (50 ng/ml) and LPS.

3.2. IL-21 induces adhesion of THP-1 cells onto endothelial EA.hy926 cells by a Syk-dependent mechanism.

Next, we verified if IL-21 could increase cellular adhesion. **Fig. 2** shows that IL-21 increases the capacity of THP-1 cells to adhere onto endothelial EA.hy926 cells by a factor of 2.3 ± 0.4 . Since we previously reported that Jak/STAT, MAPK, Akt and Syk activation was important in modulating other cellular functions by IL-21 in human monocytes and macrophages (Vallières *et al.*, 2017, Vallières *et al.*, 2013), and, knowing that these signaling pathways are also involved during monocyte adhesion (Cambien *et al.*, 2001, Chang *et al.*, 2012), we next determined the importance of these pathways/enzymes in IL-21-induced cell adhesion. Using pharmacological inhibitors, we observed that the different inhibitors could slightly to moderately inhibit the IL-21 effect (**Fig. 2B**) although a tendency was noted for p38 (SB inhibitor), but that only Syk inhibition significantly reversed the IL-21 induced adhesion (**Fig. 2C**).

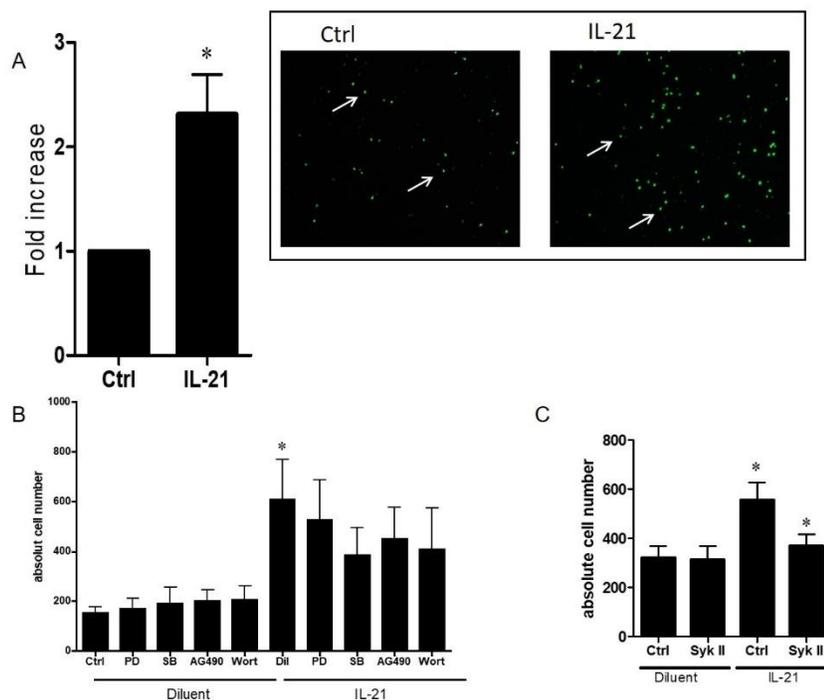


Figure 2. IL-21 enhances adhesion of human monocytes onto endothelial EA.hy926 cells. THP-1 cells were treated with diluent (Ctrl) or IL-21 (50 ng/ml) for 30 min, labelled with calcein AM and incubated on confluent EA.hy926 cells for 1h. Adhesion assay was performed and measured as described in Materials and Methods. A, results are expressed as fold of increase (means \pm SEM, n=6). Inset, Photomicrography of a representative field for Ctrl and IL-21 treated cells that were plotted in the bar graph. Dots, (arrows) represent adherent monocytes. B,C, cells were pretreated with MAPK/ERK inhibitor PD98059 (10 μ M), MAPK p38 inhibitor SB203580 (5 μ M), Jak/STAT inhibitor AG490 (30 μ M), PI3K-Akt inhibitor wortmannin (50 nM), or Syk inhibitor II prior to the adhesion assay. Results are means \pm SEM (B, n=4 and C, n=5).

3.3. Surface expression of adhesion molecules in IL-21-induced THP-1 cells.

Attachment of monocytes to the endothelial cell substratum requires interaction between adhesion molecules at the cell surface of both monocytes and endothelial cell (Kamei *et al.*, 2010, Ley *et al.*, 2007, Luo *et al.*, 2007). Therefore, we next verified if treatment with IL-21 will alter the THP-1 cell surface expression of different adhesion molecules. We first determined the basal expression of different adhesion molecules express at the surface of THP-1 cell. As shown in **Fig. 3A**, naïve THP-1 cells present a strong expression CD18, CD29, CD49D and CD11a and a weaker expression of ICAM1, ICAM3 and CD11b. As expected, THP-1 cells did not constitutively express CD62L at their cell surface (Prieto *et al.*, 1994). Of note, the same treatment with IL-21 resulting in the increasing capacity of THP-1 to adhere onto endothelial cells did not alter the basal surface expression of any of the tested molecules (**Fig. 3B-D**). The same results were obtained even after 2h of stimulation with IL-21 (*data not shown*).

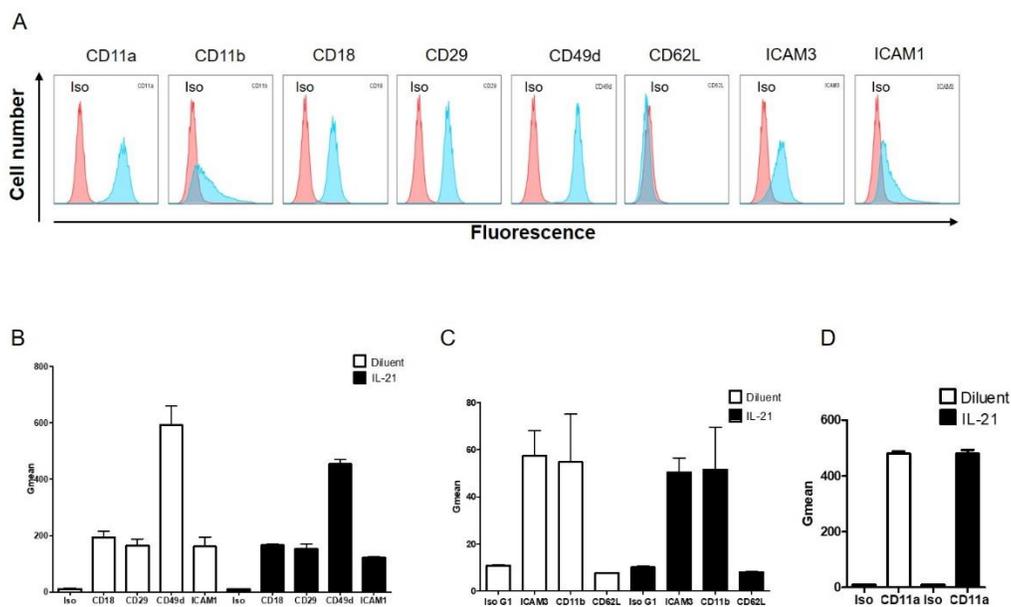


Figure 3. IL-21 does not modulate cell surface expression of adhesion molecules in human monocyte-like THP-1 cells. Three separate batches of THP-1 cells were cultured and used to determine the cell surface expression of different adhesion molecules by flow cytometry using specific antibodies directed against CD11a, CD11b, CD18, CD29, CD49d, CD62L, ICAM-1 and ICAM-3 or the corresponding isotypic controls (Iso), as described in Materials and Methods. A, cells were untreated, treated with diluent or IL-21 (50 ng/ml) for 30 min. Note that the isotypic Ctrl overlapped with CD62L. B, results are expressed as geometric mean fluorescence intensity (Gmean). Data are means \pm SEM (n=3).

3.4. Effect of IL-21 on gelatinase activity and MMP synthesis in monocytes and macrophages.

IL-21 does not modulate LPS-induced MMP-9 secretion.

Knowing that IL-21 can induce the secretion of MMPs in FLS, fibroblast and gut epithelial cells (Caruso *et al.*, 2007a, Monteleone *et al.*, 2006, Xing *et al.*, 2016), and that it can also induce gelatinase activity, we first studied its ability to increase gelatinase activity by zymography experiments using the supernatants from IL-21-induced THP-1 cells. **Fig. 4A** illustrates that, in contrast to LPS that induces MMP-9 (but not MMP-2) gelatinase activity, IL-21 (10-500 ng/ml) did not induce any of them. Using the same supernatants used for zymography experiments, LPS was found to markedly increase the MMP-9 (but not MMP-2, *data not shown*) protein expression as determined by western blot experiments. The corresponding cell pellets were used to determine the protein expression of both MMP-9 and MMP-2 and, as illustrated in **Fig. 4B**, LPS was found to increase the weak basal expression of MMP-9, unlike IL-21. In contrast to MMP-9, the intracellular basal expression of MMP-2 was relatively high, but IL-21 treatments did not alter its expression. Since IL-21 is known to reverse some LPS-induced activities, including the secretion of cytokines by human dendritic cells and murine macrophages (Li *et al.*, 2013, Stregell *et al.*, 2006), we next studied the capacity of IL-21 to modulate the LPS-induced gelatinase activity and MMP-9 expression in THP-1 cells. As shown in **Fig. 5**, IL-21 did not alter the LPS-induced gelatinase activity (**Fig. 5A**) as well as the protein expression of MMP-9 detected in the supernatants (**Fig. 5B**). Using the cell pellets to detect the intracellular MMP-2 and MMP-9 protein levels, we found that IL-21 did not change the levels induced by LPS treatment (**Fig. 5C**).

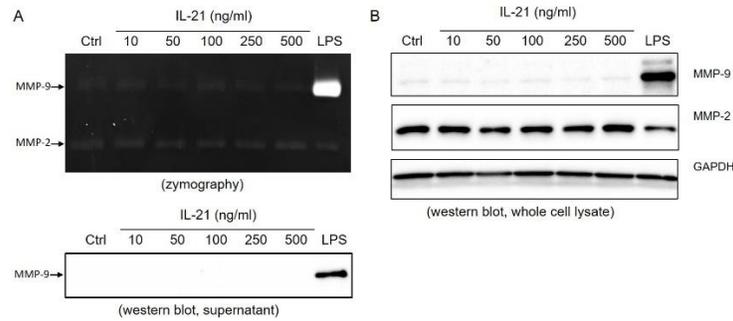


Figure 4. *IL-21 does not modulate the secretion of MMP-2 and MMP-9 and the gelatinase activity in human monocytes.* THP-1 cells were treated with diluent (Ctrl), LPS (100 ng/ml) or the indicated concentrations of IL-21 for 24h. A) gelatinase activity the supernatant was revealed by zymography as described in Materials and Methods (upper panel) and the presence of MMP-9 in the same supernatant was confirmed by western blot experiments (lower panel). Note that MMP-2 was undetectable in the supernatants (*not shown*). B, western blot analysis was used to detect the expression of MMP-2 and MMP-9 in the whole cell lysate. Results are from one representative experiment out of six.

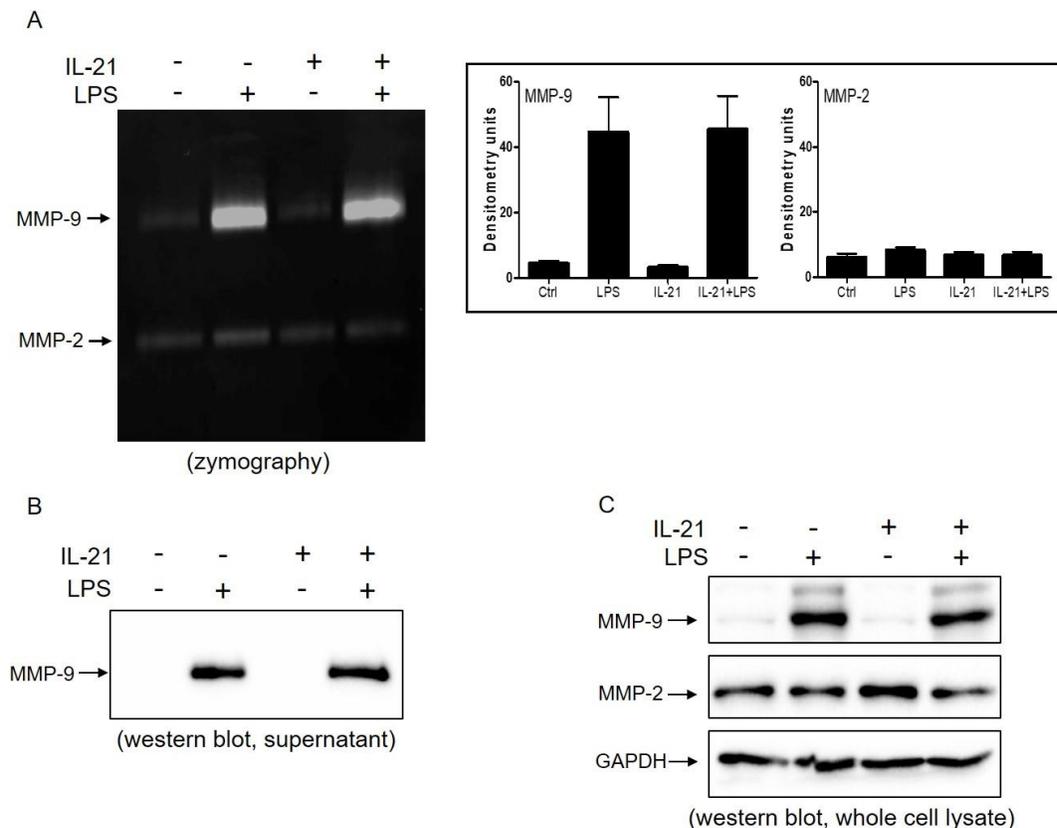


Figure 5. *IL-21 does not amplify the LPS-induced gelatinase activity and MMP-9 secretion in human monocytes.* THP-1 cells were treated with diluent, IL-21 (50 ng/ml), LPS (100 ng/ml) or IL-21 and LPS for 24h. A, gelatinase activity was determined by zymography as described in Materials and Methods. Results are from one representative experiment out of six. Inset, the densitometric analysis of gelatinase activity of MMP-9 and MMP-2 are shown (means \pm SEM, n=6). The presence of MMP-9 and MMP-2 in the supernatant (B) or in the whole cell lysate (C) was determined by western blot experiments. Note that MMP-2 was undetectable in the supernatants (*not shown*). Results are from one representative experiment out of six.

IL-21 induces gelatinase activity and MMP-9 secretion by human macrophages.

Because of the above results indicating that IL-21 does not induce gelatinase activity, we next wanted to confirm this in MDMH. In contrast, as shown in **Fig. 6A**, IL-21 can induce gelatinase activity as determined by zymography experiments (upper panel) and can also induce the secretion of MMP-9 protein into supernatants (lower panel) but not MMP-2 that, again, was undetectable in the supernatants as assessed by western blot (*data not shown*). As illustrated in **Fig. 6B**, IL-21 did not alter the intracellular the protein expression of both MMP-9 and MMP-2.

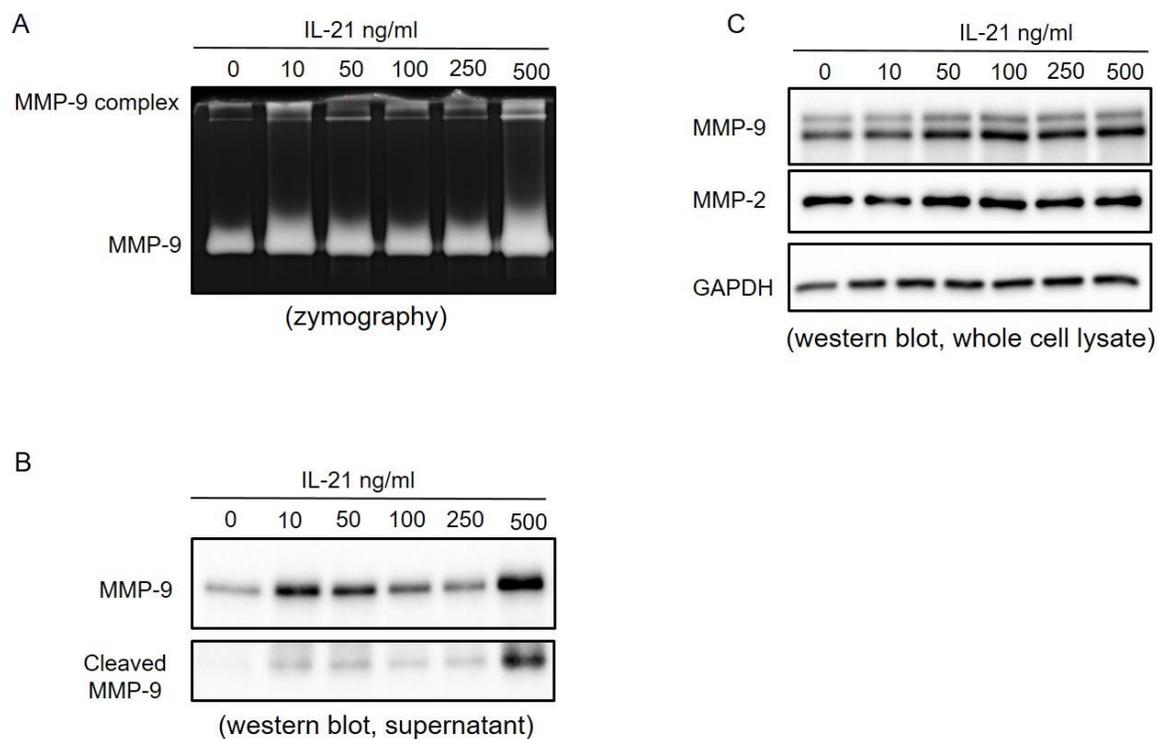


Figure 6. *IL-21 induces gelatinase activity and MMP-9 secretion in human macrophages.* MDMH were treated with diluent (Ctrl) or the indicated concentrations of IL-21 for 24h and gelatinase activity (A) or detection of MMP-9 and MMP-2 in the supernatants (B) or in whole cell lysates (C) were performed by zymography and western blot experiments, respectively. Note that MMP-2 was undetectable in the supernatants (*not shown*). Results are from one representative experiment out of three.

3.5. IL-21 does not induce the production of IL-6, MIP-1 α and GRO- α in naïve or in LPS-induced human macrophages.

IL-21 is known to possess some pro-inflammatory activities (Pelletier *et al.*, 2004b, Pelletier *et al.*, 2007b). Although it was previously found that IL-21 induced the production of different cytokines and chemokines in human monocytes (Fuqua *et al.*, 2008), such role exerts in human macrophages is not well known. **Fig. 7** illustrates that IL-21 did not alter the basal expression of the cytokine IL-6 (**Fig. 7A**) and of both chemokines MIP-1 α and GRO- α (**Fig. 7B** and **Fig. 7C**, respectively). In addition, IL-21 did not alter the ability of LPS to increase the production of these soluble mediators in MDMH.

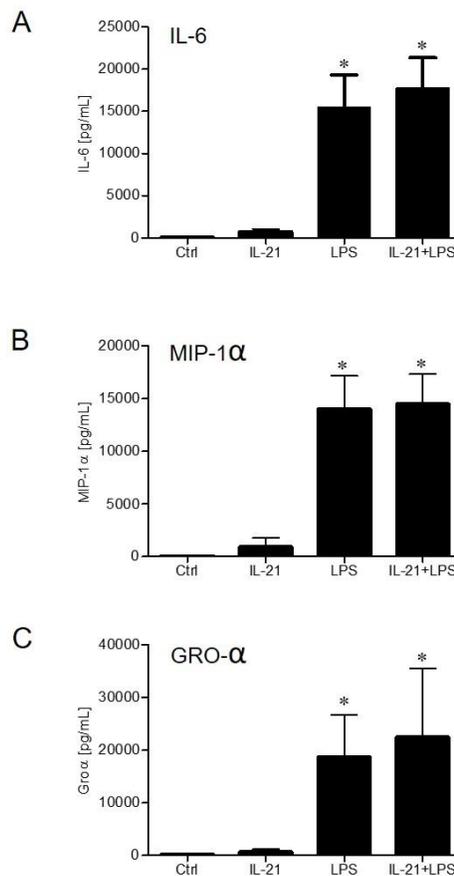


Figure 7. IL-21 does not induce the production of IL-6, MIP-1 α and GRO- α in naïve or in LPS-induced human macrophages. MDMH were treated with diluent (Ctrl), IL-21 (50 ng/ml), LPS (100 ng/ml) or a mixture of IL-21 + LPS for 24h and the production of IL-6, MIP-1 α and GRO- α was quantified by ELISA as described in Materials and Methods. Results are means \pm SEM (n=6).

4. DISCUSSION

IL-21 and other γ c (CD132) user cytokines are known to be involved in a various inflammatory diseases, including RA, systemic lupus erythematosus and cancers (Kovanen *et al.*, 2004, Spolski *et al.*, 2008a). The role of IL-21 in myeloid cell biology is becoming more defined. For example, it is well established that IL-21 can modulate monocytes and macrophages functions, especially phagocytosis and cytokine production (Fuqua *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2013, Rückert *et al.*, 2008, Vallières *et al.*, 2017, Vallières *et al.*, 2013), and to regulate dendritic cell maturation and functions (Brandt *et al.*, 2003a). Here, we show that IL-21, in contrast to LPS, is not a chemoattractant for human monocytes but increases their adhesion onto human endothelial cells. Adhesion of cells onto the endothelium is at the beginning of the process toward the migration of monocyte to the targeted site. Different cell surface adhesion molecules are involved during monocytes and endothelial cell interactions. For example, LFA-1, VLA-4 and Mac-1 are known to be involved in the monocyte rolling and arrest after their ligation to adhesion molecules, such as ICAM-1, ICAM-2 and VCAM-1 expressed at the surface of the endothelial cells (Luo *et al.*, 2007). Here, we show that IL-21 induces adhesion of the monocyte-like THP-1 cell line onto the EA.hy926 endothelial-like cell line without altering the cell surface expression of each of the individual component of LFA-1 (C18/CD11a), MAC-1 (CD18/CD11b) and VLA-4 (CD29/CD49d). In addition, we show that the cell surface expression of other adhesion molecules such as CD62L, ICAM-1 and ICAM-3 was also unaffected by IL-21 treatments. The ability of monocytes to adhere onto cell substratum depends on both the affinity and avidity of the adhesion molecules (Carman *et al.*, 2003). Therefore, our negative results might be explained by an increased affinity of some of these molecules or by a clustering of the integrins (valency) that could not be detected by our flow cytometry procedure. Also, we cannot rule out the possibility that other molecules expressed by monocyte are involved in IL-21-induced cell adhesion. For example, chemokine C-C motif receptor 1 (CCR1), CCR2 and CCR5 are known to be implicated in the arrest of monocytes (Gerhardt *et al.*, 2015), but have not been tested in our study. Finally, even though we did not directly stimulate the EA.hy926 cells, IL-21 could induce cytokine secretion by THP-1 cells which could activate the endothelial cells and in term increase expression of various adhesion molecules at their own surface and, therefore, help in the attachment of monocytes by an indirect mechanism. This remains to be determined.

Several cell signaling pathways and kinases, including MAPK, PI3K/Akt, GPCR, and Syk are known to be involved in monocyte adhesion onto vascular epithelium (Cambien *et al.*, 2001, Chang *et al.*, 2012, Ley *et al.*, 2007). Signaling events are important to increase the avidity by, for or example, mediating the conformational change of adhesion molecules needed to attach firmly to the vessel walls. We have previously shown that IL-21 can activate some cell signalling pathways in THP-1 cells (Vallières *et al.*, 2017, Vallières *et al.*, 2013). In the present study, we used pharmacological inhibitors to evaluate the importance of Erk-1/2, Akt, p38 and Syk activation in IL-21-induced cellular adhesion. The partial inhibition observed after treatment with p38 and Syk inhibitors confirm that adhesion of monocytes onto endothelial cells is a complex process involving simultaneous activation of different cells signaling pathways/kinases to be fully functional. However, our results also indicate that inhibition of only one signaling pathway was insufficient to completely reverse the IL-21 effect. Thus, these results suggest that even if IL-21 is not a direct chemoattractant for monocytes, it can help in their recruitment to target sites by promoting their adhesion to the vessel walls.

MMPs forms a family of protease sharing a conserved pro-domain, maintaining them in latent forms that can be activated under different circumstances (Marco *et al.*, 2013, Parks *et al.*, 2004). Their roles within the organism comprise a wide range of functions from tissue homeostasis and remodeling to host defense. For example, extracellular matrix degradation by MMPs helps leukocytes to migrate to the inflame site (Ley *et al.*, 2007). In addition to this, MMP secretion is also a major contributor to tissue damage caused by inflammation. Deregulation of MMP expressions have been linked to many inflammatory and autoimmune diseases such as RA and inflammatory bowel diseases, diseases in which IL-21 is known to be involved (Ahrens *et al.*, 1996, Fina *et al.*, 2007, Fingleton, 2017, Monteleone *et al.*, 2006, Nissinen *et al.*, 2014). Interestingly, IL-21 was previously reported to induce MMP secretion by intestinal fibroblasts and epithelial cells that can also be involved in inflammatory diseases (Caruso *et al.*, 2007a, Monteleone *et al.*, 2006). Herein, we show that IL-21 induces MMP-9 secretion by MDMH but not by THP-1 cells. Considering that MMPs, macrophages and IL-21 are all involved in RA, it is tempting to speculate that the direct effect of IL-21 on MMP secretion by macrophages and fibroblasts is a major contributor to the joint destruction observed in RA. Overall, our study supports the importance to pursue investigating the IL-21 modulatory activity on the biology of cells of myeloid origin in order to limit undesired side effects of future therapeutic strategies targeting the IL-21/IL-21R system.

IL-21 can induce the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes isolated from RA patients (Xing *et al.*, 2016). The role of IL-21 in the recruitment of mononuclear phagocytes to the inflammatory site is still unclear. We have previously shown that administration of IL-21 into murine air pouches recruited an increased number and proportion of neutrophils and mononuclear cells in the exudates (Pelletier *et al.*, 2004a). Because IL-21 is not chemotactic for monocytes (**Fig. 1**), it is tempting to speculate that the increased recruitment of mononuclear cells we previously reported was not induced by a direct effect of IL-21 on monocytes but rather by an indirect mechanism. Such an indirect mechanism could be an increase cytokine secretion from the murine air pouch lining cells. To support this, we previously documented that IL-4, one other γ c user cytokine, was found to attract leukocytes (mainly neutrophil (60%) and monocytic (40%) cell populations) 9h after its administration into air pouches (Ratthe *et al.*, 2009). Interestingly, we found that CCL-2 (also referred to as monocyte chemoattractant protein-1 or MCP-1) was the chemokine predominantly detected in the exudates in response to IL-4 before the arrival of leukocytes. After harvesting air pouch resident lining cells and incubated them *in vitro* with IL-4, we found that CCL-2 production was increased by IL-4 suggesting that IL-4 attracts leukocytes *in vivo* by an indirect mechanism involving the production of several analytes by, at least, resident cells.

Because we found previously that IL-21 can attract neutrophil and monocytic cells and that in contrast to LPS, IL-21 did not increase then local production of different cytokines/chemokines, including IL-6 and MIP-1 α into murine air pouches, we were interested in investigating the possibility that IL-21 could induce the production of such soluble factors by human macrophages. Here, we reported that IL-21 did not increase by itself the production of IL-6, MIP-1 α and GRO α by macrophages and did not further increase the production of these factors known to be induced by LPS (Suzuki *et al.*, 2000). This further supports that IL-21 induces leukocyte infiltration *in vivo* by a mechanism distinct than that utilizes by LPS.

5. CONCLUSIONS

We reported herein that IL-21 possesses other biological activities in monocytic cells other than its ability to increase phagocytosis. It can increase the ability of monocytes to adhere onto a cell substratum such as the EA.hy926 endothelial cells by a mechanism not involving an increase cell surface expression of CD18, CD29, CD49D, CD11a, CD11b, ICAM-1, ICAM-3 and CD62L by requiring Syk activation. IL-21 was also found to increase the release of MMP-9 into the supernatants of MDMH as well as to induce gelatinase activity but do not appear to be an important inducer of cytokines/chemokines in these cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported partially by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [grant number RGPIN-2015-04894] and by the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail [grant number 2012-0053].

REFERENCES

- [1] K. Ozaki, K. Kikly, D. Michalovich, P.R. Young, W.J. Leonard, Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor β chain, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (2000) 11439-11444.
- [2] J. Parrish-Novak, S.R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J.A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W.F. 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. Raymond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R.D. Holly, D. Foster, Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function, *Nature*, 408 (2000) 57-63.
- [3] H. Asao, C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster, K. Sugamura, Cutting Edge: The Common γ -Chain Is an Indispensable Subunit of the IL-21 Receptor Complex, *The Journal of Immunology*, 167 (2001) 1-5.

- [4] R. Spolski, W.J. Leonard, Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential, *Nature reviews. Drug discovery*, 13 (2014) 379-395.
- [5] G.P. Stathopoulos, Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation, *Anti-cancer drugs*, 21 (2010) 732-736.
- [6] T. Habib, S. Senadheera, K. Weinberg, K. Kaushansky, 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*, 41 (2002) 8725-8731.
- [7] L. Zhou, I.I. Ivanov, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W.J. Leonard, D.R. Littman, IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways, *Nat. Immunol.*, 8 (2007) 967-974.
- [8] R. Zeng, R. Spolski, E. Casas, W. Zhu, D.E. Levy, W.J. Leonard, The molecular basis of IL-21-mediated proliferation, *Blood*, 109 (2007) 4135-4142.
- [9] M. Pelletier, A. Bouchard, D. Girard, In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation, *J. Immunol.*, 173 (2004) 7521-7530.
- [10] K. Brandt, S. Bulfone-Paus, A. Jenckel, D.C. Foster, R. Paus, R. Ruckert, Interleukin-21 Inhibits Dendritic Cell-Mediated T Cell Activation and Induction of Contact Hypersensitivity In Vivo, 121 (2003) 1379-1382.
- [11] K. Brandt, S. Bulfone-Paus, D.C. Foster, R. Rückert, Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation, *Blood*, 102 (2003) 4090-4098.
- [12] C.K. Wan, P. Li, R. Spolski, J. Oh, A.B. Andraski, N. Du, Z.X. Yu, C.P. Dillon, D.R. Green, W.J. Leonard, IL-21-mediated non-canonical pathway for IL-1beta production in conventional dendritic cells, *Nature communications*, 6 (2015) 7988.
- [13] F. Vallières, D. Girard, IL-21 Enhances Phagocytosis in Mononuclear Phagocyte Cells: Identification of Spleen Tyrosine Kinase as a Novel Molecular Target of IL-21, *The Journal of Immunology*, 190 (2013) 2904-2912.
- [14] F. Vallieres, D. Girard, Mechanism involved in interleukin-21-induced phagocytosis in human monocytes and macrophages, *Clin. Exp. Immunol.*, 187 (2017) 294-303.
- [15] J.A. Bubier, T.J. Sproule, O. Foreman, R. Spolski, D.J. Shaffer, H.C. Morse, 3rd, W.J. Leonard, D.C. Roopenian, A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (2009) 1518-1523.
- [16] D. Herber, T.P. Brown, S. Liang, D.A. Young, M. Collins, K. Dunussi-Joannopoulos, IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression, *J. Immunol.*, 178 (2007) 3822-3830.

- [17] D.A. Young, M. Hegen, H.L.M. Ma, M.J. Whitters, L.M. Albert, L. Lowe, M. Senices, P.W. Wu, B. Sibley, Y. Leathurby, T.P. Brown, C. Nickerson-Nutter, J.C. Keith, M. Collins, Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 56 (2007) 1152-1163.
- [18] J.G. Ryu, J. Lee, E.K. Kim, H.B. Seo, J.S. Park, S.Y. Lee, Y.M. Moon, S.H. Yoo, Y.W. Park, S.H. Park, M.L. Cho, H.Y. Kim, Treatment of IL-21R-Fc control autoimmune arthritis via suppression of STAT3 signal pathway mediated regulation of the Th17/Treg balance and plasma B cells, *Immunol Lett*, 163 (2015) 143-150.
- [19] R. Xing, Y. Jin, L. Sun, L. Yang, C. Li, Z. Li, X. Liu, J. Zhao, Interleukin-21 induces migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Immunol.*, 184 (2016) 147-158.
- [20] G. Monteleone, R. Caruso, D. Fina, I. Peluso, V. Gioia, C. Stolfi, M.C. Fantini, F. Caprioli, R. Tersigni, L. Alessandrini, T.T. MacDonald, F. Pallone, Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21, *Gut*, 55 (2006) 1774-1780.
- [21] R. Caruso, D. Fina, I. Peluso, M.C. Fantini, C. Tosti, G. Del Vecchio Blanco, O.A. Paoluzi, F. Caprioli, F. Andrei, C. Stolfi, M. Romano, V. Ricci, T.T. MacDonald, F. Pallone, G. Monteleone, IL-21 is highly produced in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis, *J Immunol*, 178 (2007) 5957-5965.
- [22] L.N. Wang, Y.X. Cui, F. Ruge, W.G. Jiang, Interleukin 21 and Its Receptor Play a Role in Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cells, *Cancer Genomics Proteomics*, 12 (2015) 211-221.
- [23] M. Murphy-Marion, D. Girard, Titanium dioxide nanoparticles induce human eosinophil adhesion onto endothelial EA.hy926 cells via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt cell signalling pathway, *Immunobiology*, DOI 10.1016/j.imbio.2017.10.030(2017).
- [24] C. Ratthe, M. Pelletier, C.J. Roberge, D. Girard, 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 (2002) 169-175.
- [25] M.Y. Chang, D.Y. Huang, F.M. Ho, K.C. Huang, W.W. Lin, PKC-dependent human monocyte adhesion requires AMPK and Syk activation, *PLoS One*, 7 (2012) e40999.
- [26] B. Cambien, M. Pomeranz, H. Schmid-Antomarchi, M.A. Millet, V. Breittmayer, B. Rossi, A. Schmid-Alliana, Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine-induced monocytic cell adhesion, *Blood*, 97 (2001) 2031-2037.
- [27] K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat. Rev. Immunol.*, 7 (2007) 678-689.

- [28] M. Kamei, C.V. Carman, New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes, *Curr. Opin. Hematol.*, 17 (2010) 43-52.
- [29] B.H. Luo, C.V. Carman, T.A. Springer, Structural basis of integrin regulation and signaling, *Annu. Rev. Immunol.*, 25 (2007) 619-647.
- [30] J. Prieto, A. Eklund, M. Patarroyo, Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages, *Cell Immunol*, 156 (1994) 191-211.
- [31] M. Strengell, A. Lehtonen, S. Matikainen, I. Julkunen, IL-21 enhances SOCS gene expression and inhibits LPS-induced cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells, *J. Leukocyte Biol.*, 79 (2006) 1279-1285.
- [32] S.N. Li, W. Wang, S.P. Fu, J.F. Wang, H.M. Liu, S.S. Xie, B.R. Liu, Y. Li, Q.K. Lv, Z.Q. Li, W.J. Xue, B.X. Huang, W. Chen, J.X. Liu, IL-21 modulates release of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways, *Mediators Inflamm*, 2013 (2013) 548073.
- [33] M. Pelletier, A. Bouchard, D. Girard, In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation, *J Immunol*, 173 (2004) 7521-7530.
- [34] M. Pelletier, D. Girard, Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation, *ScientificWorldJournal*, 7 (2007) 1715-1735.
- [35] C.F. Fuqua, R. Akomeah, J.O. Price, S.E. Adunyah, Involvement of ERK-1/2 in IL-21-induced cytokine production in leukemia cells and human monocytes, *Cytokine*, 44 (2008) 101-107.
- [36] P.E. Kovanen, W.J. Leonard, 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.*, 202 (2004) 67-83.
- [37] R. Spolski, W.J. Leonard, Interleukin-21: Basic biology and implications for cancer and autoimmunity, *Annu. Rev. Immunol.* 2008, pp. 57-79.
- [38] R. Rückert, S. Bulfone-Paus, K. Brandt, Interleukin-21 stimulates antigen uptake, protease activity, survival and induction of CD4+ T cell proliferation by murine macrophages, *Clin Exp Immunol*, 151 (2008) 487-495.
- [39] C. Ratthe, J. Ennaciri, D.M. Garces Goncalves, S. Chiasson, D. Girard, Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism, *Mediators Inflamm*, 193970 (2009) 10.
- [40] C.V. Carman, T.A. Springer, Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized?, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15 (2003) 547-556.

- [41] T. Gerhardt, K. Ley, Monocyte trafficking across the vessel wall, *Cardiovasc. Res.*, 107 (2015) 321-330.
- [42] W.C. Parks, C.L. Wilson, Y.S. Lopez-Boado, Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, 4 (2004) 617-629.
- [43] M. Marco, C. Fortin, T. Fulop, Membrane-type matrix metalloproteinases: key mediators of leukocyte function, *J. Leukoc. Biol.*, 94 (2013) 237-246.
- [44] D. Ahrens, A.E. Koch, R.M. Pope, M. Stein-Picarella, M.J. Niedbala, Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis, *Arthritis. Rheum.*, 39 (1996) 1576-1587.
- [45] L. Nissinen, V.M. Kahari, Matrix metalloproteinases in inflammation, *Biochim. Biophys. Acta*, 1840 (2014) 2571-2580.
- [46] B. Fingleton, Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes, *Biochim. Biophys. Acta*, DOI 10.1016/j.bbamcr.2017.05.010(2017).
- [47] D. Fina, R. Caruso, F. Pallone, G. Monteleone, Interleukin-21 (IL-21) controls inflammatory pathways in the gut, *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 7 (2007) 288-291.
- [48] T. Suzuki, S. Hashimoto, N. Toyoda, S. Nagai, N. Yamazaki, H.Y. Dong, J. Sakai, T. Yamashita, T. Nukiwa, K. Matsushima, Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE, *Blood*, 96 (2000) 2584-2591.

SECTION 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION

5.1 L'IL-21 est module les fonctions des monocytes et des macrophages

L'IL-21 est une cytokine pléiotropique affectant la biologie d'une variété de cellules immunitaires et tissulaires lui conférant un rôle pathologique dans plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes comme l'AR, le SLE, le diabète, les MII, etc. (Spolski *et al.*, 2008b, Spolski *et al.*, 2014). Le rôle crucial de l'IL-21 dans la défense et le maintien de l'homéostasie de l'organisme est souligné chez les patients déficients en signalisation par l'IL-21 où les complications dues à leur système immunitaire inefficace peuvent même mener à leur décès (Erman *et al.*, 2015, Kotlarz *et al.*, 2014, Kotlarz *et al.*, 2013, Salzer *et al.*, 2014, Stepensky *et al.*, 2015). Par contre, l'IL-21 peut également être utilisée seule ou conjointement avec des anticancéreux afin d'accroître leur efficacité à combattre certains types de cancers. Dans ce cas, les propriétés stimulatrices des fonctions cytotoxiques de l'IL-21, principalement sur les lymphocytes T et les cellules NK, sont mises à profit (Moroz *et al.*, 2004, Spolski *et al.*, 2008b, Spolski *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2003). Tel que discuté précédemment, les effets biologiques de l'IL-21 sur les cellules d'origine lymphoïde sont bien caractérisés. En dépit des études révélant l'expression de l'ARNm de l'IL-21R chez les macrophages relativement rapidement suivant sa découverte et malgré que son expression protéique ait été rapportée dans les tissus de patients atteints de certaines des pathologies précédemment discutées, le rôle de l'IL-21 dans la biologie des monocytes et des macrophages n'a retenu que peu d'attention. Par conséquent, l'objectif principal de ce projet de recherche était de caractériser les effets de l'IL-21 sur les certaines fonctions cellulaires des monocytes et des macrophages humains et de déterminer les voies de signalisation impliquées dans ces modulations. Ce projet de recherche s'est donc appliqué à évaluer le potentiel modulateur de l'IL-21 sur le recrutement des monocytes (chimiotactisme et adhésion cellulaire), la phagocytose, la sécrétion de métalloprotéases et de cytokines et chimiokines tout en vérifiant les voies de signalisation qui pourraient y être impliquées. Les résultats présentés dans les deux premiers articles montrent que l'IL-21 module la phagocytose des monocytes et des macrophages humains. Ils montrent qu'elle augmente leur capacité à effectuer la phagocytose effectuée par l'entremise des FcR (GRM opsonisés) et celle effectuée par l'entremise des récepteurs des lectines (zymosans), sans toutefois affecter celle effectuée par l'entremise des récepteurs du complément (bactéries). La troisième publication met en relief l'implication de l'IL-21 dans le recrutement des monocytes par sa capacité à accroître leur adhésion aux cellules endothéliales.

De plus, elle montre également la capacité de l'IL-21 à stimuler la sécrétion de MMP-9 par les macrophages, lui suggérant ainsi un rôle potentiel dans le remodelage ou la destruction des tissus. Finalement, à travers les trois articles, nos résultats montrent que plusieurs des voies de signalisation connues pour être activées par l'IL-21 et être impliquées dans la modulation des fonctions d'autres types cellulaires sont également responsables de la modulation des fonctions des monocytes et des macrophages. Ces voies de signalisation incluent celle des Jak/STAT, de la PI3K/Akt et des MAPK. En plus des voies classiquement activées par l'IL-21, nos résultats montrent également, pour la première fois, que Syk est une cible moléculaire de l'IL-21. L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse supporte notre hypothèse de recherche stipulant que l'IL-21 est un agent modulateur des fonctions des monocytes et des macrophages. Par conséquent, elle peut donc agir à différents niveaux afin de façonner la réponse inflammatoire.

5.1.1 Expression du récepteur dans les monocytes et les macrophages

Bien que l'expression de l'ARNm et protéique de l'IL-21R α ait été rapportée dans les monocytes et les macrophages humains et murins, et que certaines études suggèrent que l'IL-21 peut moduler certaines de leurs fonctions cellulaires, à notre connaissance aucune étude n'avait à ce jour, clairement démontré une expression de l'IL-21R α à la surface de ces cellules. Avant toutes choses, il était donc essentiel de déterminer si l'ensemble des cellules étudiées exprimaient bel et bien l'IL-21R α . Nos résultats montrent donc pour la première fois que ces types cellulaires expriment un récepteur de l'IL-21 fonctionnel, composé à la fois de l'IL-21R α et de la chaîne γ . Bien que prévisible, ce résultat revêtait une importance particulière pour la suite de ce projet de recherche. En effet, de quelle manière l'IL-21 pouvait-elle agir sur les monocytes et les macrophages s'ils n'exprimaient pas un récepteur fonctionnel ? De plus, nos résultats non publiés présentés à l'annexe 1, montrent que les MDMH différenciés en présence de M-CSF expriment également un IL-21R fonctionnel dans le même ordre de grandeur que les MDMH-GM-CSF, et ce, malgré les différences morphologiques engendrées par les deux méthodes de différenciation. De surcroît, l'IL-21 augmente également leur capacité à effectuer la phagocytose de GRM opsonisés. Finalement, nos résultats combinés à ceux de la littérature suggèrent ainsi que l'IL-21R est exprimé de manière constitutive dans les monocytes et macrophages. Ils appuient donc notre hypothèse selon laquelle l'IL-21 peut agir comme modulateur des fonctions des monocytes et des macrophages. Ils suggèrent également que l'IL-21 peut moduler la réponse inflammatoire

en affectant la biologie des monocytes et des macrophages et que le développement de stratégies thérapeutiques visant le système IL-21/IL-21R pourrait affecter leurs fonctions.

5.1.2 Voies de signalisation activées par l'IL-21 dans les monocytes et les macrophages

L'IL-21 est connue pour activer plusieurs voies de signalisation, principalement la voie Jak/STAT, celle de la PI3K/Akt et celle des MAPK. Elles sont notamment impliquées dans la régulation de la survie, dans la maturation, la différenciation et dans l'activation des fonctions exécutrices de plusieurs leucocytes (Leonard *et al.*, 2016). Les résultats de la présente thèse montrent que, encore une fois, l'activation de ces voies de signalisation par l'IL-21 est au centre de la modulation des fonctions des monocytes et des macrophages. Ils identifient également un nouvel intermédiaire de signalisation de l'IL-21, la protéine kinase Syk, qui est impliquée dans la régulation de la phagocytose et dans l'adhésion cellulaire des monocytes et des macrophages. De plus, nos résultats montrent une association constitutive entre l'IL-21R α et Syk, suggérant que la liaison de l'IL-21 à son récepteur peut directement activer Syk. Ces résultats sont corroborés par une étude récente montrant que la stimulation des lymphocytes B CD21+ au CD40L, CpG ou anti-IgM combinée à l'IL-21 augmente l'expression et le niveau de phosphorylation de Syk (Keller *et al.*, 2017). Ainsi, l'IL-21 est en mesure de réguler l'activation de Syk dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes. L'activation de Syk est liée à différentes fonctions cellulaires, telles que le réarrangement du cytosquelette, la production de ROS, la différenciation, la prolifération, la survie et la sécrétion de cytokines dans différents leucocytes. De plus, Syk est connue pour être située en aval de l'activation de plusieurs voies de signalisation activées par l'IL-21, telle que la PI3K/Akt (Mocsai *et al.*, 2010). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'activation directe de Syk suivant la liaison de l'IL-21 à son récepteur pourrait être le point de départ des événements de signalisation initiant la modulation des différentes fonctions lui étant associées. Par conséquent, il serait pertinent de vérifier s'il existe une certaine hiérarchie dans les voies de signalisation activées par l'IL-21 dans les monocytes et les macrophages. Ceci pourrait s'accomplir en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de chacun des intermédiaires de signalisation activés par l'IL-21, pour, par la suite, vérifier l'activation de l'ensemble des voies de signalisation en réponse à l'IL-21. Par exemple, en prétraitant les cellules avec l'inhibiteur pharmacologique de Syk avant leur stimulation par l'IL-21 pour ensuite vérifier l'activation de AKT, des Jak, des STAT, des MAPK, et

ainsi de suite pour chacun des intermédiaires. Ainsi, si l'inhibiteur de Syk renverse l'activation des MAPK en réponse à l'IL-21, cela suggère que l'activation de Syk est située en amont de celle des MAPK.

Les monocytes/macrophages, l'IL-21 et l'ensemble des voies de signalisation mentionnées jouent un rôle dans le développement de plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes telles que l'AR, les MII, la fibrose et le SLE (Gadina *et al.*, 2017, Grainger *et al.*, 2017, Grammatikos *et al.*, 2013, Kaur *et al.*, 2013, Kyttaris, 2012, McInnes *et al.*, 2017, Spolski *et al.*, 2014, Wynn *et al.*, 2016). Il est donc possible d'envisager que l'activation de ces voies de signalisation par l'IL-21 dans les monocytes et les macrophages contribuent activement au développement des lésions observées. Conséquemment, le développement de stratégies thérapeutiques visant ces voies de signalisation pour le traitement de plusieurs maladies inflammatoires est supporté par nos résultats.

5.1.3 L'IL-21 favorise le recrutement des monocytes

Le recrutement des monocytes au site inflammatoire est un évènement essentiel pour contribuer non seulement à l'élimination des pathogènes ou des débris cellulaires, mais également pour permettre la réparation du tissu et son retour à l'homéostasie. La perturbation d'une ou de plusieurs des différentes étapes du recrutement peut donc avoir des répercussions catastrophiques pour l'organisme allant d'une infection persistante à une inflammation incontrôlée menant à des pathologies diverses (Nathan, 2002). Plusieurs études ont suggéré que l'IL-21 pouvait jouer un rôle dans la migration de différents types cellulaires dont les fibroblastes synoviaux, les DC et les lymphocytes T cytotoxiques, les neutrophiles et les cellules monocucléées (Hecker *et al.*, 2009, Pelletier *et al.*, 2004a, Van Belle *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2015, Xing *et al.*, 2016). Dans certains cas, le recrutement des leucocytes en réponse à l'IL-21 est même responsable de l'apparition de la maladie. Par exemple, dans un modèle de diabète, l'IL-21 est directement impliquée dans le recrutement des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la destruction des îlots pancréatiques causant ainsi l'apparition du diabète (Hecker *et al.*, 2009). L'ensemble de ces résultats suggère que l'IL-21 peut moduler le recrutement des monocytes. Toutefois, nos résultats du troisième article indiquent que l'IL-21 n'est pas un agent chimioattractant direct pour les monocytes. Cependant, ils montrent que l'IL-21 favorise l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales par des mécanismes dépendant de

l'activation de Syk. De plus, le rôle de l'activation de Syk dans l'adhésion cellulaire de nombreux leucocytes, incluant les monocytes, est bien connu. Elle permet, entre autres, de transduire le signal provenant du CD18, une composante de MAC-1 (Frommhold *et al.*, 2007, Hirahashi *et al.*, 2006, Mocsai *et al.*, 2006, Mocsai *et al.*, 2010, Vines *et al.*, 2001). Ainsi, l'association constitutive entre l'IL-21R α et Syk que nous avons montrée semble permettre une amplification de la signalisation initiée par Syk suivant la liaison de l'IL-21 à son récepteur, ce qui pourrait expliquer un des mécanismes par lesquels l'IL-21 augmente l'adhésion des monocytes.

L'augmentation de l'adhésion observée n'est pas le résultat d'un changement au niveau de l'expression des principales molécules permettant l'adhésion des monocytes (MAC-1, LFA-1, VLA4, ICAM1, ICAM3 et CD62L). Par conséquent, bien que nos résultats aient identifié certaines des voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, les mécanismes cellulaires exacts qu'elles déclenchent qui permettent d'accroître l'adhésion cellulaire demeurent inconnus. Ces mécanismes pourraient inclure l'expression accrue d'autres molécules d'adhésion qui n'ont pas été testées. Par exemple, les protéines JAML, le CCR2 et le CCR5 sont également impliqués dans l'adhésion des monocytes et leurs expressions pourraient être modulées en réponse à l'IL-21 (Gerhardt *et al.*, 2015). De plus, il serait pertinent de vérifier si l'IL-21 permet d'accroître l'avidité des molécules dont l'expression a été évaluée. En effet, l'avidité des molécules d'adhésion se mesure selon plusieurs paramètres qui comprennent l'augmentation de l'affinité et de la valence. La valence se définit comme la densité de surface d'une molécule. Ainsi, cette densité de surface peut être modulée soit par l'augmentation de l'expression d'une molécule, soit par sa concentration à un endroit donné issue d'un mouvement latéral d'un groupe de molécules (Ley *et al.*, 2007, Luo *et al.*, 2007). La méthode utilisée dans notre étude, la cytométrie en flux, permet uniquement de vérifier l'expression totale d'une molécule donnée. Par conséquent, il est fortement plausible que l'IL-21 augmente l'affinité d'une molécule donnée ou qu'elle permet de regrouper plusieurs exemplaires de cette molécule à un endroit précis agissant ici sur la valence. Par exemple la microscopie confocale aurait pu être utilisée afin de vérifier le regroupement d'une molécule donnée, par exemple MAC-1, à l'interface entre les monocytes (THP-1) et les cellules endothéliales. Cela permettrait d'évaluer un des paramètres de l'avidité et ainsi approfondir les mécanismes d'action de l'IL-21 dans l'augmentation de l'adhésion des monocytes observée.

Il est bien connu que l'IL-21 est surexprimée dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques que l'AR, le SLE et les MII (Sarra *et al.*, 2013, Spolski *et al.*, 2014). Ce type d'inflammation est caractérisé par un remplacement des cellules immunitaires présentes au site inflammatoire passant d'une majorité de neutrophiles à une majorité de cellules mononucléées incluant les monocytes, les macrophages et les lymphocytes. La présence accrue de monocytes et de macrophages contribue aux dommages infligés aux tissus (Medzhitov, 2008). Ainsi, l'expression d'une molécule permettant le recrutement de ces cellules peut directement contribuer à l'exacerbation de la maladie. Nos résultats montrent que l'IL-21 favorise l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire, une des étapes dans leur recrutement au tissu cible. Le recrutement des monocytes par l'IL-21 pourrait donc contribuer à la fois à l'élimination de pathogènes et à la pathologie de différentes maladies inflammatoires dans lesquelles les monocytes et les macrophages jouent un rôle clef.

5.1.4 L'IL-21 module la phagocytose des monocytes et des macrophages

La capacité accrue à exercer la phagocytose est ce qui distingue le mieux les phagocytes professionnels, dont font partie les monocytes et les macrophages, des autres types cellulaires. La phagocytose est un processus actine-dépendant permettant l'internalisation et la dégradation d'une particule endogène ou exogène. C'est une fonction essentielle des monocytes et des macrophages qui permet à la fois l'élimination d'agents pathogènes, de particules environnementales, de débris cellulaires et de cellules apoptotiques visant le retour à l'homéostasie du tissu comme objectif ultime. Afin d'être en mesure de reconnaître la multitude de cibles à éliminer, les phagocytes professionnels disposent de tout un arsenal de récepteurs permettant de les distinguer et d'initier par la suite une réponse appropriée (Underhill *et al.*, 2012a, Underhill *et al.*, 2002). Les résultats présentés dans les articles 1 et 2 indiquent que l'IL-21 module les capacités phagocytaires des monocytes et des macrophages. En effet, elle stimule la phagocytose effectuée par l'entremise des FcR et des récepteurs des lectines, et ce par des mécanismes dépendant de l'activation de la voie Jak/STAT, de la PI3K/Akt, des MAPKs et de Syk. Ces résultats suggèrent que l'IL-21 peut contribuer à contrer les infections en favorisant l'élimination des agents pathogènes. Certaines données issues de la littérature appuient ce raisonnement. Par exemple, dans un modèle murin d'infection chronique du tractus gastro-intestinal par *Helicobacter pylori*, les souris IL-21^{-/-} montrent une plus grande colonisation de la

bactérie (Caruso *et al.*, 2007a). De plus, plusieurs types d'infections chroniques sont présents chez les patients déficients en signalisation à l'IL-21 (Kotlarz *et al.*, 2014). Ainsi, il est plausible que l'augmentation de la phagocytose observée en réponse à l'IL-21 peut contribuer à éliminer certains de ces pathogènes. De plus, l'élimination de complexes immuns par les macrophages stimulés à l'IL-10 favorise un phénotype de macrophages régulateurs (Mosser *et al.*, 2008). Donc, dans un contexte où les macrophages se retrouvent en présence de complexes immuns et d'IL-10, l'IL-21 pourrait contribuer à la formation de macrophages régulateurs en favorisant l'internalisation de ces derniers. Ceci aurait pour effet d'accroître les propriétés anti-inflammatoires des macrophages. Par conséquent, quoique l'IL-21 ait été identifiée comme un facteur aggravant l'inflammation, elle pourrait, sous certaines conditions, contribuer à atténuer la réponse inflammatoire. Ces résultats illustrent toute la complexité du système IL-21/IL-21R.

5.1.5 L'IL-21 stimule la sécrétion de MMP-9 par les macrophages

La famille des MMP possède des rôles biologiques variés allant du remodelage des tissus à la régulation de certains médiateurs inflammatoires en passant par la régulation de la perméabilité vasculaire. Les MMP sont donc impliquées à toutes les étapes de la réponse inflammatoire (Nathan, 2002, Nissinen *et al.*, 2014, Parks *et al.*, 2004). Il n'est donc pas étonnant d'observer une dérégulation de l'expression de ces protéines dans plusieurs pathologies inflammatoires. Nos résultats du troisième article montrent que l'IL-21 stimule la sécrétion de MMP-9 par les macrophages. Connaissant le rôle de l'IL-21, des macrophages et de MMP-9 dans plusieurs pathologies, il est concevable que la sécrétion de MMP-9 par les macrophages en réponse à l'IL-21 contribue de manière directe aux lésions observées, notamment chez la personne arthritique ou souffrante d'une MII. De plus, étant donné que MMP-9 clive différents médiateurs inflammatoires, la contribution de l'IL-21 au développement de la pathologie pourrait se faire de manière plus indirecte. Par exemple, il est connu que MMP-9 clive l'IL-8, la proforme de l'IL-1 β et le TNF latent accroissant ainsi leur activité biologique (Ito *et al.*, 1996, Nissinen *et al.*, 2014, Van den Steen *et al.*, 2000). Ces molécules contribuent activement au recrutement de plusieurs leucocytes, dont les neutrophiles. Ceci revêt une importance particulière dans certains désordres inflammatoires, tels que l'AR et les MII, où l'IL-21, les monocytes/macrophages et les neutrophiles

font partie des facteurs identifiés comme aggravants la maladie (Fournier *et al.*, 2012, Sarra *et al.*, 2013, Spolski *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2017).

5.1.6 L'IL-21 ne module pas la sécrétion de cytokines de façon importante

La sécrétion de cytokines par les macrophages régule les différentes étapes de la réponse inflammatoire. Les cytokines qu'ils sécrètent permettent à la fois le recrutement des leucocytes, la modulation de la réponse adaptative, la réparation des tissus et la résolution de l'inflammation. Ainsi, une perturbation au niveau du profil de cytokines sécrétées peut avoir d'énormes conséquences (Nathan, 2002, Nathan *et al.*, 2010). Certaines études ont démontré que l'IL-21 pouvait moduler la sécrétion de cytokines des monocytes et des macrophages. Par exemple, dans les monocytes humains une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires a été observée (Fuqua *et al.*, 2008). À l'opposé, dans les macrophages murins, l'IL-21 inhibe la sécrétion de cytokines en réponse au LPS (Li *et al.*, 2013). Or, nos résultats présentés dans le troisième article montrent que dans les macrophages humains différenciés au GM-CSF, l'IL-21 ne module pas de manière importante la sécrétion de cytokines lorsqu'elle est utilisée seule ou en combinaison avec le LPS. Ces résultats divergents illustrent la nécessité de bien identifier le type de macrophages utilisés pour effectuer l'étude tel que suggéré par Murray *et al.* (2014), puisqu'une différence au niveau de l'origine de l'espèce, de la méthode de différenciation et la méthodologie des traitements expérimentaux peut influencer les résultats obtenus et rendre difficiles les comparaisons. De plus, il existe des différences notables entre l'activation des macrophages murins et humains, principalement au niveau de l'expression d'oxyde nitrique et de ses voies de synthèse (Murray *et al.*, 2011a, Schneemann *et al.*, 2007). Nos résultats suggèrent que ces différences interspèce pourraient également s'exprimer au niveau de la sécrétion de cytokines en réponse à certains stimuli tels que l'IL-21.

5.2 Limitation du projet de recherche

La prochaine section permettra de remettre en perspectives les résultats obtenus en tenant compte des limites et contraintes inhérentes à tous projets de recherche.

5.2.1 Les modèles d'études

Les résultats présentés dans cette thèse sont le résultat d'expériences *in vitro* menées sur des cellules isolées du sang humain et différenciées en plaques. De plus, une lignée cellulaire issue d'une leucémie a également été utilisée comme modèle de monocytes humains. Puisque les macrophages sont des cellules ayant une grande plasticité qui, par conséquent, s'adaptent rapidement au changement, ce projet de recherche aurait bénéficié d'une meilleure caractérisation des macrophages suivant leurs différenciations au GM-CSF. Ainsi, les comparaisons futures avec d'autres études auraient été facilitées. De plus, suivant les caractéristiques obtenues, la relation avec les populations physiologiques de macrophages peuplant l'ensemble des tissus du corps aurait été mieux définie. Il aurait également été pertinent de séparer les monocytes selon les trois sous-types (classique, intermédiaire et non-classique) afin de vérifier s'ils répondent de manière similaire à l'IL-21. Par exemple, l'utilisation de globules rouges de mouton opsonisés marqués au PKH26, un marqueur fluorescent des membranes cellulaires, et le marquage du CD14 et du CD16 à l'aide d'Ac couplés à un fluorochrome lors des essais de phagocytose de globules rouges de mouton opsonisés aurait permis une séparation des différents sous-types suivant une analyse en cytométrie en flux. Finalement, bien que la lignée cellulaire THP-1 soit un modèle de monocytes humains accepté et répandu dans la littérature, certaines différences existent entre ces cellules et les monocytes primaires. Par exemple, les cellules THP-1 expriment plus faiblement le CD14 comparativement aux monocytes humains ce qui réduit considérablement leur réponse au LPS, notamment relativement à la sécrétion de cytokines (Bosshart *et al.*, 2016). L'interprétation des résultats obtenus dans les cellules THP-1 doit donc considérer ces différences.

En condition homéostatique ou inflammatoire, les monocytes et les macrophages doivent intégrer des centaines voire des milliers de signaux issus de leur environnement. Il est difficilement possible de recréer un environnement aussi complexe *in vitro*. Ainsi, étant donné le peu d'études relatant les effets de l'IL-21 dans ces cellules, notre recherche s'est appliquée à définir l'effet direct

de l'IL-21 sur la biologie des monocytes et des macrophages. Il faut prendre en considération que, *in vivo*, leur réponse face à l'IL-21 pourrait être modulée par la présence d'autres facteurs. Ces facteurs pourraient amplifier ou inhiber la réponse à l'IL-21. Ainsi, comme les cellules traitées à l'IL-21 étaient sorties de leur contexte biologique, les inférences résultantes des expériences présentées doivent en tenir compte.

5.2.2 Voies de signalisation et inhibiteurs pharmacologiques

De par leur disponibilité et leur facilité d'utilisation, les inhibiteurs pharmacologiques ont été favorisés dans ce projet de recherche afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans la modulation des fonctions des monocytes et des macrophages. Toutefois, étant donné que certains des inhibiteurs utilisés peuvent parfois inhiber de façon non spécifique d'autres voies de signalisation, il aurait été pertinent de compléter notre analyse par l'utilisation d'autres techniques, notamment celles permettant une réduction de l'expression protéique. Ainsi, l'utilisation d'ARN interférant aurait permis de confirmer l'implication de ces différentes voies de signalisation dans la modulation des fonctions observée. Par exemple, en réduisant l'expression protéique de chaque intermédiaire de signalisation de la voie Jak/STAT séparément, il aurait été possible de déterminer plus précisément le ou lesquels sont impliqués dans la modulation des différentes fonctions des monocytes et des macrophages observée suivant le traitement à l'IL-21.

5.3 Perspectives

5.3.1 Perspective à court terme et moyen terme

À l'exception des expériences impliquant une sécrétion de molécules (cytokines et MMP), la stimulation des monocytes et des macrophages à l'IL-21 était de relativement courte durée, variant de 30 minutes à 3 heures. Par conséquent, il serait pertinent de traiter les macrophages à l'IL-21 à plus long terme (pouvant aller jusqu'à plusieurs jours). Ainsi, la caractérisation phénotypique des macrophages suivant ce traitement pourrait être mieux définie en utilisant différents marqueurs d'activation et de différenciation, par exemple l'expression de différentes cytokines, chimiokines et différents récepteurs (Murray *et al.*, 2014). Afin de déterminer l'effet d'une exposition prolongée à l'IL-21, les capacités phagocytaires de ces macrophages de différents types de particules pourraient également y être évaluées.

L'efferocytose est une fonction des macrophages qui est essentielle à la résolution de l'inflammation. L'accumulation de cellules apoptotique contribue à l'établissement de nombreuses maladies inflammatoires où la surexpression de l'IL-21 est également un facteur aggravant. Étant donné que nos résultats montrent que l'IL-21 module la phagocytose des monocytes et des macrophages, il serait plus que pertinent de déterminer si elle peut aussi moduler leur capacité d'efferocytose. De plus, la modulation de la phagocytose des macrophages par l'IL-21 dans un contexte *in vivo* pourrait être évaluée en utilisant, par exemple, le modèle murin de la péritonite causée par le thioglycolate pour ensuite injecter de l'IL-21 dans le péritoine des souris. Par la suite, différentes particules, telles que des billes latex ou des cellules apoptotiques fluorescentes pourrait être administrées dans le péritoine. La phagocytose serait alors évaluée par cytométrie en flux après le marquage des macrophages à l'aide de différents marqueurs comme le marqueur de maturation F4/80.

Bien que nos résultats n'aient pas démontré la modulation de la production de cytokines par l'IL-21, des études suggèrent que certaines conditions expérimentales permettent à l'IL-21 de moduler la sécrétion de cytokines (Fuqua *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2013, Pelletier *et al.*, 2004a). Afin de bien jouer leur rôle dans la régulation de l'inflammation, les monocytes et les macrophages doivent être en mesure de sécréter les cytokines appropriées en fonction du type de stimuli auxquels ils sont exposés. Ainsi, il serait très approprié de déterminer si la stimulation à l'IL-21 module la sécrétion de cytokines suivant la phagocytose de différents types de particules, telles que les GRM opsonisés, zymosan et cellules apoptotiques. Par exemple, comme l'IL-21 inhibe la réponse au LPS, elle pourrait inversement favoriser la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires suivant la phagocytose de cellules apoptotiques. Les surnageants des expériences de phagocytoses seraient récupérés et la sécrétion de cytokines ensuite quantifiée par des essais multiplex.

Finalement, sachant que l'IL-21 inhibe les capacités de présentation antigénique des cellules dendritiques (Ansen *et al.*, 2008, Brandt *et al.*, 2003a, Brandt *et al.*, 2003b) et considérant que les macrophages peuvent également agir à titre de cellules présentatrices d'antigènes, il serait d'autant plus pertinent de vérifier si l'IL-21 module la présentation antigénique par les macrophages. Pour ce faire, la modulation de l'expression des molécules du CMH et celle des co-récepteurs nécessaires à la présentation antigénique en réponse à l'IL-21 pourraient être évaluées. De plus, la capacité des macrophages à stimuler la prolifération antigène spécifique des lymphocytes T en réponse à l'IL-21 pourrait être évaluée.

5.3.2 Perspectives à long terme

Dans l'optique de mieux évaluer le rôle de la modulation des fonctions des monocytes et des macrophages par l'IL-21 dans un contexte de maladie inflammatoire, l'utilisation de cellules issues de tissus de personnes atteintes d'AR, de SLE et de MII serait pertinente. Ainsi, il serait possible d'évaluer s'il existe des différences dans leur réponse à l'IL-21 comparativement à celle des cellules issues de donneurs sains. Cela permettrait de mieux cerner si la modulation des fonctions par l'IL-21 observée dans les MDMH différenciés en plaques pouvait également l'être dans ces monocytes et macrophages primaires. Finalement, l'utilisation de souris dont l'expression de l'IL-21R a été supprimée uniquement dans les monocytes et les macrophages dans des modèles de maladies inflammatoires permettrait de mieux définir si la modulation des fonctions des monocytes et des macrophages par l'IL-21 observée *in vitro* joue un rôle dans l'apparition de ces maladies.

5.4 Conclusion

Les travaux de recherches présentés dans cette thèse permettent de mieux comprendre les effets de l'IL-21 sur la biologie des monocytes et des macrophages. Il a été clairement établi que ces cellules expriment un IL-21R fonctionnel (γc et IL-21R α). Ainsi, l'IL-21 favorise le recrutement des monocytes et accroît leur capacité à effectuer la phagocytose effectuée par l'entremise des FcR. Chez les macrophages, elle augmente la phagocytose médiée par les FcR et celle de particule de zymosan en plus d'augmenter la sécrétion de MMP-9. Chez les deux types cellulaires étudiés, l'IL-21 ne module pas ou très faiblement la sécrétion de cytokines. Comme observé dans les autres leucocytes, l'activation de la voie Jak/STAT, celle de la PI3K et celle des MAPK par l'IL-21 est liée à la modulation des fonctions cellulaires. De plus, ces travaux ont permis d'établir que la protéine Syk est une nouvelle cible moléculaire de l'IL-21. L'activation de ces différentes voies de signalisation est au cœur de la régulation d'autres fonctions cellulaires des monocytes et des macrophages. Il est donc possible que par l'entremise de ces voies de signalisation, l'IL-21 module d'autres fonctions.

Références

- Abraham C & Cho JH (2009) Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 361(21):2066-2078.
- Aderem A & Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623.
- Agarwal A, Salem P & Robbins KC (1993) Involvement of p72syk, a protein-tyrosine kinase, in Fc gamma receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 268(21):15900-15905.
- Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M & Niedbala MJ (1996) Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 39(9):1576-1587.
- Alam J, Jantan I & Bukhari SNA (2017) Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.* 92:615-633.
- Allard EL, Hardy MP, Leignadier J, Marquis M, Rooney J, Lehoux D & Labrecque N (2007) Overexpression of IL-21 promotes massive CD8+ memory T cell accumulation. *Eur. J. Immunol.* 37(11):3069-3077.
- Allenbach C, Zufferey C, Perez C, Launois P, Mueller C & Tacchini-Cottier F (2006) Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. *J. Immunol.* 176(11):6656-6664.
- Alloatti A, Kotsias F, Magalhaes JG & Amigorena S (2016) Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol. Rev.* 272(1):97-108.
- Alms WJ, Atamas SP, Yurovsky VV & White B (1996) Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing. *Mol. Immunol.* 33(4-5):361-370.
- Alves NL, Arosa FA & van Lier RA (2005) IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8+ T cells. *J. Immunol.* 175(2):755-762.
- Andersson AK, Feldmann M & Brennan FM (2008) Neutralizing IL-21 and IL-15 inhibits pro-inflammatory cytokine production in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 68(1):103-111.
- Ansen S, Butler MO, Berezovskaya A, Murray AP, Stevenson K, Nadler LM & Hirano N (2008) Dissociation of its opposing immunologic effects is critical for the optimization of antitumor CD8+ T-cell responses induced by interleukin 21. *Clin. Cancer Res.* 14(19):6125-6136.
- Araki N (2006) Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Front. Biosci.* 11:1479-1490.

- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS & et al. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 31(3):315-324.
- Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D & Sugamura K (2001) Cutting Edge: The Common γ -Chain Is an Indispensable Subunit of the IL-21 Receptor Complex. *The Journal of Immunology* 167(1):1-5.
- Atamas SP, Choi J, Yurovsky VV & White B (1996) An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation. *J. Immunol.* 156(2):435-441.
- Attridge K, Kenefeck R, Wardzinski L, Qureshi OS, Wang CJ, Manzotti C, Okkenhaug K & Walker LS (2014) IL-21 promotes CD4 T cell responses by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent upregulation of CD86 on B cells. *J. Immunol.* 192(5):2195-2201.
- Attridge K, Wang CJ, Wardzinski L, Kenefeck R, Chamberlain JL, Manzotti C, Kopf M & Walker LS (2012) IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. *Blood* 119(20):4656-4664.
- Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R & Tangye SG (2008) IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J. Immunol.* 181(3):1767-1779.
- Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY, Chan TD, Palendira U, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Choo S, Bleasel KE, Peake J, King C, French MA, Engelhard D, Al-Hajjar S, Al-Muhsen S, Magdorf K, Roesler J, Arkwright PD, Hissaria P, Riminton DS, Wong M, Brink R, Fulcher DA, Casanova JL, Cook MC & Tangye SG (2010) B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J. Exp. Med.* 207(1):155-171.
- Bae S, Kim H, Lee N, Won C, Kim HR, Hwang YI, Song YW, Kang JS & Lee WJ (2012) alpha-Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 189(1):365-372.
- Baggiolini M, Dewald B & Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55:97-179.
- Baker AH, Edwards DR & Murphy G (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 115(Pt 19):3719-3727.
- Barker BR, Gladstone MN, Gillard GO, Panas MW & Letvin NL (2010) Critical role for IL-21 in both primary and memory anti-viral CD8+ T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* 40(11):3085-3096.

- Benbarche S, Strassel C, Angenieux C, Mallo L, Freund M, Gachet C, Lanza F & de la Salle H (2017) Dual role of IL-21 in megakaryopoiesis and platelet homeostasis. *Haematologica* 102(4):637-646.
- Bendelac A, Savage PB & Teyton L (2007) The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25:297-336.
- Benoit M, Desnues B & Mege J-L (2008) Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* 181(6):3733-3739.
- Berglund LJ, Avery DT, Ma CS, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Bacchetta R, Bezrodnik L, Dadi H, Roifman CM, Fulcher DA, Ziegler JB, Smart JM, Kobayashi M, Picard C, Durandy A, Cook MC, Casanova JL, Uzel G & Tangye SG (2013) IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* 122(24):3940-3950.
- Bessa J, Kopf M & Bachmann MF (2010) Cutting edge: IL-21 and TLR signaling regulate germinal center responses in a B cell-intrinsic manner. *J. Immunol.* 184(9):4615-4619.
- Bhatia S, Curti B, Ernstoff MS, Gordon M, Heath EI, Miller WH, Jr., Puzanov I, Quinn DI, Flaig TW, VanVeldhuizen P, Byrnes-Blake K, Freeman JA, Bittner R, Hunder N, Souza S & Thompson JA (2014) Recombinant interleukin-21 plus sorafenib for metastatic renal cell carcinoma: a phase 1/2 study. *J Immunother Cancer* 2:2.
- Blom B & Spits H (2006) Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* 24:287-320.
- Bondensgaard K, Breinholt J, Madsen D, Omkvist DH, Kang L, Worsaae A, Becker P, Schiodt CB & Hjorth SA (2007) The existence of multiple conformers of interleukin-21 directs engineering of a superpotent analogue. *J. Biol. Chem.* 282(32):23326-23336.
- Bosshart H & Heinzelmann M (2016) THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med* 4(21):438.
- Bowdish DME & Gordon S (2009) Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function. *Immunol. Rev.* 227:19-31.
- Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ & Nutt SL (2004) IL-21 Induces the Functional Maturation of Murine NK Cells. *The Journal of Immunology* 172(4):2048-2058.
- Brandt K, Bulfone-Paus S, Foster DC & Rückert R (2003a) Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102(12):4090-4098.

- Brandt K, Bulfone-Paus S, Jenckel A, Foster DC, Paus R & Ruckert R (2003b) Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 121(6):1379-1382.
- Brandt K, Bulfone-Paus S, Jenckel A, Foster DC, Paus R & Ruckert R (2003c) Interleukin-21 Inhibits Dendritic Cell-Mediated T Cell Activation and Induction of Contact Hypersensitivity In Vivo. 121(6):1379-1382.
- Brenne AT, Ro TB, Waage A, Sundan A, Borset M & Hjorth-Hansen H (2002) Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. *Blood* 99(10):3756-3762.
- Brown GD (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* 6(1):33-43.
- Bubier JA, Bennett SM, Sproule TJ, Lyons BL, Olland S, Young DA & Roopenian DC (2007) Treatment of BXSB-Yaa mice with IL-21R-Fc fusion protein minimally attenuates systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1110:590-601.
- Bubier JA, Sproule TJ, Foreman O, Spolski R, Shaffer DJ, Morse HC, 3rd, Leonard WJ & Roopenian DC (2009) A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(5):1518-1523.
- Burgess SJ, Marusina AI, Pathmanathan I, Borrego F & Coligan JE (2006) IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 176(3):1490-1497.
- Byrne A & Reen DJ (2002) Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.* 168(4):1968-1977.
- Cambien B, Pomeranz M, Schmid-Antomarchi H, Millet MA, Breittmayer V, Rossi B & Schmid-Alliana A (2001) Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine-induced monocytic cell adhesion. *Blood* 97(7):2031-2037.
- Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL, Russell SM, Drago J, Noguchi M, Grinberg A, Bloom ET & et al. (1995) Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2(3):223-238.
- Carman CV & Springer TA (2003) Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* 15(5):547-556.
- Caruso R, Botti E, Sarra M, Esposito M, Stolfi C, Diluvio L, Giustizieri ML, Pacciani V, Mazzotta A, Campione E, Macdonald TT, Chimenti S, Pallone F, Costanzo A & Monteleone G (2009) Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis. *Nat. Med.* 15(9):1013-1015.

- Caruso R, Fina D, Peluso I, Fantini MC, Tosti C, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Caprioli F, Andrei F, Stolfi C, Romano M, Ricci V, MacDonald TT, Pallone F & Monteleone G (2007a) IL-21 is highly produced in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis. *J. Immunol.* 178(9):5957-5965.
- Caruso R, Fina D, Peluso I, Stolfi C, Fantini MC, Gioia V, Caprioli F, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Macdonald TT, Pallone F & Monteleone G (2007b) A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3 α , by gut epithelial cells. *Gastroenterology* 132(1):166-175.
- Casey KA & Mescher MF (2007) IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J. Immunol.* 178(12):7640-7648.
- Caza T & Landas S (2015) Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int* 2015:521957.
- Chang MY, Huang DY, Ho FM, Huang KC & Lin WW (2012) PKC-dependent human monocyte adhesion requires AMPK and Syk activation. *PLoS One* 7(7):e40999.
- Chapuis AG, Roberts IM, Thompson JA, Margolin KA, Bhatia S, Lee SM, Sloan HL, Lai IP, Farrar EA, Wagener F, Shibuya KC, Cao J, Wolchok JD, Greenberg PD & Yee C (2016) T-Cell Therapy Using Interleukin-21-Primed Cytotoxic T-Cell Lymphocytes Combined With Cytotoxic T-Cell Lymphocyte Antigen-4 Blockade Results in Long-Term Cell Persistence and Durable Tumor Regression. *J. Clin. Oncol.* 10.1200/jco.2015.65.5142.
- Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS & Mackay CR (2004) T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J. Immunol.* 173(1):68-78.
- Cocco RE & Ucker DS (2001) Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Mol. Biol. Cell* 12(4):919-930.
- Coquet JM, Chakravarti S, Smyth MJ & Godfrey DI (2008) Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 180(11):7097-7101.
- Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ & Godfrey DI (2007) IL-21 Is Produced by NKT Cells and Modulates NKT Cell Activation and Cytokine Production. *The Journal of Immunology* 178(5):2827-2834.
- Cox D, Chang P, Kurosaki T & Greenberg S (1996) Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J. Biol. Chem.* 271(28):16597-16602.

- Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL & DeFranco AL (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* 186(7):1027-1039.
- Davis ID, Brady B, Kefford RF, Millward M, Cebon J, Skrumsager BK, Mouritzen U, Hansen LT, Skak K, Lundsgaard D, Frederiksen KS, Kristjansen PE & McArthur G (2009) Clinical and biological efficacy of recombinant human interleukin-21 in patients with stage IV malignant melanoma without prior treatment: a phase IIa trial. *Clin. Cancer Res.* 15(6):2123-2129.
- Davis ID, Skrumsager BK, Cebon J, Nicholaou T, Barlow JW, Moller NP, Skak K, Lundsgaard D, Frederiksen KS, Thygesen P & McArthur GA (2007) An open-label, two-arm, phase I trial of recombinant human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 13(12):3630-3636.
- de Toter D, Meazza R, Zupo S, Cutrona G, Matis S, Colombo M, Balleari E, Pierri I, Fabbi M, Capaia M, Azzarone B, Gobbi M, Ferrarini M & Ferrini S (2006) Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 107(9):3708-3715.
- Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL & Gregory CD (1998) Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392(6675):505-509.
- Devitt A, Pierce S, Oldreive C, Shingler WH & Gregory CD (2003) CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ.* 10(3):371-382.
- Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, van Haren SD, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, Beaumont T, Scheeren FA & Spits H (2008) STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J. Immunol.* 180(7):4805-4815.
- Distler JHW, Juengel A, Kowal-Bielecka O, Michel BA, Gay RE, Sprott H, Matucci-Cerinic M, Chilla M, Reich K, Kalden JR, Mueller-Ladner U, Lorenz HM, Gay S & Distler O (2005) Expression of Interleukin-21 Receptor in Epidermis From Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 52(3):856-864.
- Ditzel HJ (2004) The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol. Med.* 10(1):40-45.
- Dong C, Davis RJ & Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20:55-72.

- Duffield JS, Ware CF, Ryffel B & Savill J (2001) Suppression by apoptotic cells defines tumor necrosis factor-mediated induction of glomerular mesangial cell apoptosis by activated macrophages. *Am. J. Pathol.* 159(4):1397-1404.
- Duffin R, Leitch AE, Fox S, Haslett C & Rossi AG (2010) Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunol. Rev.* 236:28-40.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA & Mosser DM (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukocyte Biol.* 80(6):1298-1307.
- Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, Tuukkanen J, Sormunen R, Liakka A, Thesleff I, Kraal G & Tryggvason K (1995) Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 80(4):603-609.
- Elsaesser H, Sauer K & Brooks DG (2009) IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* 324(5934):1569-1572.
- Eng EW, Bettio A, Ibrahim J & Harrison RE (2007) MTOC reorientation occurs during FcγR-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol. Biol. Cell* 18(7):2389-2399.
- Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, Salzer E, Cagdas D, Esenboga S, Akcoren Z, Sanal O, Tezcan I & Boztug K (2015) Combined immunodeficiency with CD4 lymphopenia and sclerosing cholangitis caused by a novel loss-of-function mutation affecting IL21R. *Haematologica* 100(6):e216-219.
- Erwig L-P & Henson PM (2007) Immunological Consequences of Apoptotic Cell Phagocytosis. *Am. J. Pathol.* 171(1):2-8.
- Erwig LP & Henson PM (2008) Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 15(2):243-250.
- Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, Leonard WJ & Lipsky PE (2005) IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol.* 175(12):7867-7879.
- Fadeel B, Xue D & Kagan V (2010) Programmed cell clearance: Molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396(1):7-10.
- Fadok V, Voelker D, Campbell P, Cohen J, Bratton D & Henson P (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* 148(7):2207-2216.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY & Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production

- through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of Clinical Investigation* 101(4):890-898.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RAB & Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405(6782):85-90.
- Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM & Bratton DL (2001) Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276(2):1071-1077.
- Fina D, Caruso R, Pallone F & Monteleone G (2007) Interleukin-21 (IL-21) controls inflammatory pathways in the gut. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 7(4):288-291.
- Fina D, Sarra M, Fantini MC, Rizzo A, Caruso R, Caprioli F, Stolfi C, Cardolini I, Dottori M, Boirivant M, Pallone F, Macdonald TT & Monteleone G (2008) Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21. *Gastroenterology* 134(4):1038-1048.
- Fingleton B (2017) Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *Biochim. Biophys. Acta* 10.1016/j.bbamcr.2017.05.010.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M & O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147(11):3815-3822.
- Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL & Lowell CA (2000) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* 191(4):669-682.
- Fournier BM & Parkos CA (2012) The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 5(4):354-366.
- Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, DosReis GA & Lopes MF (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403(6766):199-203.
- Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, Weber J, Marsland BJ, Oxenius A & Kopf M (2009) IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* 324(5934):1576-1580.
- Frohlich A, Marsland BJ, Sonderegger I, Kurrer M, Hodge MR, Harris NL & Kopf M (2007) IL-21 receptor signaling is integral to the development of Th2 effector responses in vivo. *Blood* 109(5):2023-2031.
- Frommhold D, Mannigel I, Schymeinsky J, Mocsai A, Poeschl J, Walzog B & Sperandio M (2007) Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC Immunol.* 8:31.
- Fullard JF, Kale A & Baker NE (2009) Clearance of apoptotic corpses. *Apoptosis* 14(8):1029-1037.

- Fuqua CF, Akomeah R, Price JO & Adunyah SE (2008) Involvement of ERK-1/2 in IL-21-induced cytokine production in leukemia cells and human monocytes. *Cytokine* 44(1):101-107.
- Gadina M, Gazaniga N, Vian L & Furumoto Y (2017) Small molecules to the rescue: Inhibition of cytokine signaling in immune-mediated diseases. *J. Autoimmun.* 10.1016/j.jaut.2017.06.006.
- Gagnon J, Ramanathan S, Leblanc C & Ilangumaran S (2007) Regulation of IL-21 signaling by suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in CD8(+) T lymphocytes. *Cell. Signal.* 19(4):806-816.
- Gerhardt T & Ley K (2015) Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 107(3):321-330.
- Getahun A & Cambier JC (2015) Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol. Rev.* 268(1):66-73.
- Gharibi T, Majidi J, Kazemi T, Dehghanzadeh R, Motallebnezhad M & Babaloo Z (2016) Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology* 221(2):357-367.
- Ghazizadeh S, Bolen JB & Fleit HB (1994) Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* 269(12):8878-8884.
- Ghazizadeh S, Bolen JB & Fleit HB (1995) Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc-gamma-RII in monocytic THP-1 cells. *Biochem. J.* 305:669-674.
- Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC & Nicholson-Weller A (2000) Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J. Exp. Med.* 192(12):1797-1808.
- Ginhoux F & Guilliams M (2016) Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44(3):439-449.
- Goodridge HS, Underhill DM & Touret N (2012) Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. *Traffic* 13(8):1062-1071.
- Goodridge HS, Wolf AJ & Underhill DM (2009) Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol. Rev.* 230(1):38-50.
- Gordon S & Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity* 32 (5):593-604.
- Gordon S & Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5(12):953-964.

- Grainger JR, Konkel JE, Zangerle-Murray T & Shaw TN (2017) Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Pflugers Arch.* 469(3-4):527-539.
- Grammatikos AP, Ghosh D, Devlin A, Kytтарыс VC & Tsokos GC (2013) Spleen tyrosine kinase (Syk) regulates systemic lupus erythematosus (SLE) T cell signaling. *PLoS One* 8(8):e74550.
- Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R & Hazen SL (2006) Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 203(12):2613-2625.
- Grunwald V, Desar IM, Haanen J, Fiedler W, Mouritzen U, Olsen MW & van Herpen CM (2011) A phase I study of recombinant human interleukin-21 (rIL-21) in combination with sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC). *Acta Oncol.* 50(1):121-126.
- Habib T, Senadheera S, Weinberg K & Kaushansky K (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* 41(27):8725-8731.
- Hagn M, Schwesinger E, Ebel V, Sontheimer K, Maier J, Beyer T, Syrovets T, Laumonnier Y, Fabricius D, Simmet T & Jahrsdorfer B (2009) Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21. *J. Immunol.* 183(3):1838-1845.
- Hagn M, Sontheimer K, Dahlke K, Brueggemann S, Kaltenmeier C, Beyer T, Hofmann S, Lunov O, Barth TF, Fabricius D, Tron K, Nienhaus GU, Simmet T, Schrezenmeier H & Jahrsdorfer B (2012) Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. *Immunol. Cell Biol.* 90(4):457-467.
- Halle S, Halle O & Forster R (2017) Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol.* 38(6):432-443.
- Hamada F, Aoki M, Akiyama T & Toyoshima K (1993) Association of immunoglobulin G Fc receptor II with Src-like protein-tyrosine kinase Fgr in neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(13):6305-6309.
- Hamming OJ, Kang L, Svensson A, Karlsen JL, Rahbek-Nielsen H, Paludan SR, Hjorth SA, Bondensgaard K & Hartmann R (2012) Crystal structure of interleukin-21 receptor (IL-21R) bound to IL-21 reveals that sugar chain interacting with WSXWS motif is integral part of IL-21R. *J. Biol. Chem.* 287(12):9454-9460.
- Hampton MB, Kettle AJ & Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92(9):3007-3017.

- Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y & Nagata S (2004) Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304(5674):1147-1150.
- Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, Horiguchi S, Okamoto Y, Nakayama T, Suzuki N, Yeh WC, Akira S, Kitamura H, Ohara O, Seino K & Taniguchi M (2006) IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J. Exp. Med.* 203(13):2929-2937.
- Harrison RE & Grinstein S (2002) Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton. *Biochem. Cell Biol.* 80(5):509-515.
- Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, Minami M, Inagaki T, Miyagawa S, Sawa Y, Murakami M, Kumanogoh A, Yamauchi-Takahara K, Okumura M, Kishimoto T, Komuro I, Shirai M, Sakata Y & Nakaoka Y (2015) Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(20):E2677-2686.
- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, Garcia-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS & Merad M (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38(4):792-804.
- Hecker A, Kaufmann A, Hecker M, Padberg W & Grau V (2009) Expression of interleukin-21, interleukin-21 receptor alpha and related type I cytokines by intravascular graft leukocytes during acute renal allograft rejection. *Immunobiology* 214(1):41-49.
- Herber D, Brown TP, Liang S, Young DA, Collins M & Dunussi-Joannopoulos K (2007) IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J. Immunol.* 178(6):3822-3830.
- Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ & Wynn TA (2001) Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 167(11):6533-6544.
- Hinrichs CS, Spolski R, Paulos CM, Gattinoni L, Kerstann KW, Palmer DC, Klebanoff CA, Rosenberg SA, Leonard WJ & Restifo NP (2008) IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* 111(11):5326-5333.

- Hirahashi J, Mekala D, Van Ziffle J, Xiao L, Saffaripour S, Wagner DD, Shapiro SD, Lowell C & Mayadas TN (2006) Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity* 25(2):271-283.
- Hoffmann PR, de Cathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, Ridley AJ, Fadok VA & Henson PM (2001) Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J. Cell Biol.* 155(4):649-659.
- Hua F, Comer GM, Stockert L, Jin B, Nowak J, Pleasic-Williams S, Wunderlich D, Cheng J & Beebe JS (2014) Anti-IL21 receptor monoclonal antibody (ATR-107): Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamic evaluation in healthy volunteers: a phase I, first-in-human study. *J. Clin. Pharmacol.* 54(1):14-22.
- Huber M, Brustle A, Reinhard K, Guralnik A, Walter G, Mahiny A, von Low E & Lohoff M (2008) IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(52):20846-20851.
- Hume DA (2015) The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Front Immunol* 6:370.
- Huynh M-LN, Fadok VA & Henson PM (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 109(1):41-50.
- Huynh MLN, Malcolm KC, Kotaru C, Tilstra JA, Westcott JY, Fadok VA & Wenzel SE (2005) Defective apoptotic cell phagocytosis attenuates prostaglandin E-2 and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in severe asthma alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 172(8):972-979.
- Ignatenko S, Skrumsager BK & Mouritzen U (2016) Safety, PK, and PD of recombinant anti-interleukin-21 monoclonal antibody in a first-in-human trial. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 54(4):243-252.
- Imhof BA & Aurrand-Lions M (2004) Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 4(6):432-444.
- Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F, Habenicht AJ, Ziegler-Heitbrock L & Randolph GJ (2010) Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115(3):e10-19.
- Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y & Mori Y (1996) Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 271(25):14657-14660.

- Jang E, Cho SH, Park H, Paik DJ, Kim JM & Youn J (2009) A Positive Feedback Loop of IL-21 Signaling Provoked by Homeostatic CD4(+)CD25(-) T Cell Expansion Is Essential for the Development of Arthritis in Autoimmune K/BxN Mice. *J. Immunol.* 182(8):4649-4656.
- Jin H, Carrio R, Yu A & Malek TR (2004) Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J. Immunol.* 173(1):657-665.
- Jin H, Oyoshi MK, Le Y, Bianchi T, Koduru S, Mathias CB, Kumar L, Le Bras S, Young D, Collins M, Grusby MJ, Wenzel J, Bieber T, Boes M, Silberstein LE, Oettgen HC & Geha RS (2009) IL-21R is essential for epicutaneous sensitization and allergic skin inflammation in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 119(1):47-60.
- Johnson SA, Pleiman CM, Pao L, Schneringer J, Hippen K & Cambier JC (1995) Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J. Immunol.* 155(10):4596-4603.
- Jungel A, Distler JHW, Kurowska-Stolarska M, Seemayer CA, Seibl R, Forster A, Michel BA, Gay RE, Emmrich F, Gay S & Distler O (2004) Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 50(5):1468-1476.
- Kaczmarek RS & Muftic GJ (1991) The cytokine receptor superfamily. *Blood Rev.* 5(3):193-203.
- Kamei M & Carman CV (2010) New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes. *Curr. Opin. Hematol.* 17(1):43-52.
- Karrich JJ, Jachimowski LC, Nagasawa M, Kamp A, Balzarolo M, Wolkers MC, Uittenbogaart CH, van Ham SM & Blom B (2013) IL-21 stimulated human plasmacytoid dendritic cells secrete Granzyme B, which impairs their capacity to induce T cell proliferation. *Blood* 10.1182/blood-2012-08-452995.
- Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, Johnson KA, Witek JS, Senices M, Konz RF, Wurster AL, Donaldson DD, Collins M, Young DA & Grusby MJ (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(4):559-569.
- Kaur M, Singh M & Silakari O (2013) Inhibitors of switch kinase 'spleen tyrosine kinase' in inflammation and immune-mediated disorders: a review. *Eur. J. Med. Chem.* 67:434-446.
- Keller B, Stumpf I, Strohmeier V, Usadel S, Verhoeven E, Eibel H & Warnatz K (2017) High SYK Expression Drives Constitutive Activation of CD21^{low} B Cells. *J. Immunol.* 198(11):4285-4292.

- Kenis H, van Genderen H, Deckers NM, Lux PAG, Hofstra L, Narula J & Reutelingsperger CPM (2006) Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp. Cell Res.* 312(6):719-726.
- Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S & Pawson T (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* 18(7):4209-4220.
- Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL, Gilliland LK, Rowley RB, Bolen JB & Ledbetter JA (1993) Cross-linking of Fc γ receptor I (Fc γ RI) and receptor II (Fc γ RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 268(32):24442-24448.
- Kim HP, Korn LL, Gamero AM & Leonard WJ (2005) Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells. *J. Biol. Chem.* 280(26):25291-25297.
- Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM & Nicholson-Weller A (1997) Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* 7(3):345-355.
- Kobayashi SD, Voyich JM & DeLeo FR (2003) Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect.* 5(14):1337-1344.
- Konforte D & Paige CJ (2006) Identification of cellular intermediates and molecular pathways induced by IL-21 in human B cells. *J. Immunol.* 177(12):8381-8392.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M & Kuchroo VK (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448(7152):484-487.
- Kotlarz D, Zietara N, Milner JD & Klein C (2014) Human IL-21 and IL-21R deficiencies: two novel entities of primary immunodeficiency. *Curr. Opin. Pediatr.* 26(6):704-712.
- Kotlarz D, Zietara N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, Krawitz PM, Robinson PN, Hecht J, Puchalka J, Gertz EM, Schaffer AA, Lawrence MG, Kardava L, Pfeifer D, Baumann U, Pfister ED, Hanson EP, Schambach A, Jacobs R, Kreipe H, Moir S, Milner JD, Schwille P, Mundlos S & Klein C (2013) Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J. Exp. Med.* 210(3):433-443.
- Kovanen PE & Leonard WJ (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. *Immunol. Rev.* 202:67-83.
- Krieser RJ & White K (2002) Engulfment mechanism of apoptotic cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14(6):734-738.

- Kwiatkowska K & Sobota A (1999) Signaling pathways in phagocytosis. *BioEssays* 21(5):422-431.
- Kwok SK, Cho ML, Park MK, Oh HJ, Park JS, Her YM, Lee SY, Youn J, Ju JH, Park KS, Kim SI, Kim HY & Park SH (2012) Interleukin-21 promotes osteoclastogenesis in humans with rheumatoid arthritis and in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis. Rheum.* 64(3):740-751.
- Kwon H, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Kim HP, Oh J, Tunyaplin C, Carotta S, Donovan CE, Goldman ML, Tailor P, Ozato K, Levy DE, Nutt SL, Calame K & Leonard WJ (2009) Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity* 31(6):941-952.
- Kyttaris VC (2012) Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs. *Drug Des. Devel. Ther.* 6:245-250.
- Lawrence DW, King SB, Frazier WA & Koenig JM (2009) Decreased CD47 expression during spontaneous apoptosis targets neutrophils for phagocytosis by monocyte-derived macrophages. *Early Hum. Dev.* 85(10):659-663.
- Lebre MC, Vieira PL, Tang MW, Aarrass S, Helder B, Newsom-Davis T, Tak PP & Sreaton GR (2017) Synovial IL-21/TNF-producing CD4+ T cells induce joint destruction in rheumatoid arthritis by inducing matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes. *J. Leukoc. Biol.* 101(3):775-783.
- Leonard WJ (1996) The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: Defective cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Med.* 47:229-239.
- Leonard WJ (2001) Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 1(3):200-208.
- Leonard WJ & Lin JX (2000) Cytokine receptor signaling pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105(5):877-888.
- Leonard WJ & O'Shea JJ (1998) JAKS AND STATS: Biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 16:293-322.
- Leonard WJ & Wan CK (2016) IL-21 Signaling in Immunity. *F1000Res* 5.
- Leonard WJ, Zeng R & Spolski R (2008) Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age. *J. Leukocyte Biol.* 84(2):348-356.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI & Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7(9):678-689.
- Li J, Shen W, Kong K & Liu Z (2006) Interleukin-21 Induces T-cell Activation and Proinflammatory Cytokine Secretion in Rheumatoid Arthritis. *Scand. J. Immunol.* 64(5):515-522.
- Li SN, Wang W, Fu SP, Wang JF, Liu HM, Xie SS, Liu BR, Li Y, Lv QK, Li ZQ, Xue WJ, Huang BX, Chen W & Liu JX (2013) IL-21 modulates release of proinflammatory cytokines in LPS-

- stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Mediators Inflamm.* 2013:548073.
- Li Y, Bleakley M & Yee C (2005) IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response. *J. Immunol.* 175(4):2261-2269.
- Li Y & Yee C (2008) IL-21 mediated Foxp3 suppression leads to enhanced generation of antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 111(1):229-235.
- Libby P, Nahrendorf M, Pittet MJ & Swirski FK (2008) Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque - Not all monocytes are created equal. *Circulation* 117(25):3168-3170.
- Liu SM, Lee DH, Sullivan JM, Chung D, Jager A, Shum BO, Sarvetnick NE, Anderson AC & Kuchroo VK (2011) Differential IL-21 signaling in APCs leads to disparate Th17 differentiation in diabetes-susceptible NOD and diabetes-resistant NOD.Ldd3 mice. *J. Clin. Invest.* 121(11):4303-4310.
- Lucas M, Stuart LM, Zhang A, Hodivala-Dilke K, Febbraio M, Silverstein R, Savill J & Lacy-Hulbert A (2006) Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. *J. Immunol.* 177(6):4047-4054.
- Luo BH, Carman CV & Springer TA (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25:619-647.
- Luthje K, Kallies A, Shimohakamada Y, Belz GT, Light A, Tarlinton DM & Nutt SL (2012) The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat. Immunol.* 13(5):491-498.
- Luzina IG, Lockatell V, Todd NW, Keegan AD, Hasday JD & Atamas SP (2011) Splice isoforms of human interleukin-4 are functionally active in mice in vivo. *Immunology* 132(3):385-393.
- Ma HL, Whitters MJ, Konz RF, Senices M, Young DA, Grusby MJ, Collins M & Dunussi-Joannopoulos K (2003) IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma. *J. Immunol.* 171(2):608-615.
- Maeda M, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Minami K, Nakamaru Y, Takagi D, Fukuda S & Onoe K (2007) IL-21 enhances dendritic cell ability to induce interferon-gamma production by natural killer T cells. *Immunobiology* 212(7):537-547.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25(12):677-686.
- Marco M, Fortin C & Fulop T (2013) Membrane-type matrix metalloproteinases: key mediators of leukocyte function. *J. Leukoc. Biol.* 94(2):237-246.

- Marcos-Ramiro B, Garcia-Weber D & Millan J (2014) TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thromb. Haemost.* 112(6):1088-1102.
- Marijnissen RJ, Roeleveld DM, Young D, Nickerson-Nutter C, Abdollahi-Roodsaz S, Garcia de Aquino S, van de Loo FA, van Spriel AB, Boots AM, van den Berg WB & Koenders MI (2014) Interleukin-21 receptor deficiency increases the initial toll-like receptor 2 response but protects against joint pathology by reducing Th1 and Th17 cells during streptococcal cell wall arthritis. *Arthritis Rheumatol* 66(4):886-895.
- Marquez A, Orozco G, Martinez A, Palomino-Morales R, Fernandez-Arquero M, Mendoza JL, Taxonera C, Diaz-Rubio M, Gomez-Garcia M, Nieto A, Lopez-Nevot MA, de la Concha EG, Martin J & Urcelay E (2009) Novel association of the interleukin 2-interleukin 21 region with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 104(8):1968-1975.
- Martinez FO & Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6:13.
- McColl SR (2002) Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol. Cell Biol.* 80(5):489-496.
- McDonald PP, Fadok VA, Bratton D & Henson PM (1999) Transcriptional and Translational Regulation of Inflammatory Mediator Production by Endogenous TGF- β in Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology* 163(11):6164-6172.
- McInnes IB & Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7(6):429-442.
- McInnes IB & Schett G (2017) Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 389(10086):2328-2337.
- McPhee CG, Bubier JA, Sproule TJ, Park G, Steinbuck MP, Schott WH, Christianson GJ, Morse HC, 3rd & Roopenian DC (2013) IL-21 is a double-edged sword in the systemic lupus erythematosus-like disease of BXSB.Yaa mice. *J. Immunol.* 191(9):4581-4588.
- McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I & Overall CM (2002) Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100(4):1160-1167.
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435.
- Mehta DS, Wurster AL, Weinmann AS & Grusby MJ (2005) NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(6):2016-2021.

- Mehta DS, Wurster AL, Whitters MJ, Young DA, Collins M & Grusby MJ (2003) IL-21 Induces the Apoptosis of Resting and Activated Primary B Cells. *The Journal of Immunology* 170(8):4111-4118.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J & Mortha A (2013) The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31:563-604.
- Meszaros AJ, Reichner JS & Albina JE (2000) Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J. Immunol.* 165(1):435-441.
- Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, Won MH, Rho J & Kwon YG (2005) TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J. Immunol.* 175(1):531-540.
- Mittal A, Murugaiyan G, Beynon V, Hu D & Weiner HL (2012) IL-27 induction of IL-21 from human CD8+ T cells induces granzyme B in an autocrine manner. *Immunol. Cell Biol.* 90(8):831-835.
- Mocsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL & Lowell CA (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat. Immunol.* 7(12):1326-1333.
- Mocsai A, Ruland J & Tybulewicz VL (2010) The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat. Rev. Immunol.* 10(6):387-402.
- Monteleone G, Caruso R, Fina D, Peluso I, Gioia V, Stolfi C, Fantini MC, Caprioli F, Tersigni R, Alessandroni L, MacDonald TT & Pallone F (2006) Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut* 55(12):1774-1780.
- Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Blanco GD, Caruso R, Tersigni R, Alessandroni L, Biancone L, Naccari GC, Macdonald TT & Pallone F (2005) Interleukin-21 enhances T-helper cell type 1 signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 128(3):687-694.
- Moret FM, Hack CE, van der Wurff-Jacobs KM, de Jager W, Radstake TR, Lafeber FP & van Roon JA (2013) Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity. *Arthritis Res. Ther.* 15(5):R155.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC & Moretta A (2005) Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol. Lett.* 100(1):7-13.

- Moroz A, Eppolito C, Li Q, Tao J, Clegg CH & Shrikant PA (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. *J. Immunol.* 173(2):900-909.
- Mosser DM & Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8(12):958-969.
- Muller-Newen G, Stope MB, Kraus T & Ziegler P (2017) Development of platelets during steady state and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 101(5):1109-1117.
- Munoz LE, Gaipal US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR & Herrmann M (2005) SLE - a disease of clearance deficiency? *Rheumatology* 44(9):1101-1107.
- Murphy-Marion M & Girard D (2017) Titanium dioxide nanoparticles induce human eosinophil adhesion onto endothelial EA.hy926 cells via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt cell signalling pathway. *Immunobiology* 10.1016/j.imbio.2017.10.030.
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN & Wynn TA (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41(1):14-20.
- Murray PJ & Wynn TA (2011a) Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukocyte Biol.* 89(4):557-563.
- Murray PJ & Wynn TA (2011b) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11(11):723-737.
- Nagata S (2010) Apoptosis and autoimmune diseases. *Clearance of Dying Cells in Healthy and Diseased Immune Systems*, (Annals of the New York Academy of Sciences, Mevorach D (Édit.) Blackwell Publishing, Oxford Vol 1209. p 10-16.
- Nara H, Rahman M, Araki A, Jin L, Takeda Y & Asao H (2013) IL-21 isoform is a membrane-bound ligand and activates directly interacted cells. *Cytokine* [http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.010\(0\)](http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.010(0)).
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917):846-852.
- Nathan C & Ding A (2010) Nonresolving Inflammation. *Cell* 140(6):871-882.
- Navazo MDP, Daviet L, Savill J, Ren Y, Leung LLK & McGregor JL (1996) Identification of a Domain (155–183) on CD36 Implicated in the Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271(26):15381-15385.

- Nishimura H, Fujimoto A, Tamura N, Yajima T, Wajjwalku W & Yoshikai Y (2005) A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing. *FASEB J.* 19(1):19-28.
- Nishimura H, Yajima T, Naiki Y, Tsunobuchi H, Umemura M, Itano K, Matsuguchi T, Suzuki M, Ohashi PS & Yoshikai Y (2000) Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J. Exp. Med.* 191(1):157-170.
- Nissinen L & Kahari VM (2014) Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1840(8):2571-2580.
- Niu X, He D, Zhang X, Yue T, Li N, Zhang JZ, Dong C & Chen G (2010) IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.* 71(4):334-341.
- Noguchi M, Yi HF, Rosenblatt HM, Filipovich AH, Adelstein S, Modi WS, McBride OW & Leonard WJ (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73(1):147-157.
- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM & Dong C (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448(7152):480-483.
- Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q & Dong C (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29(1):138-149.
- Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH & Dong C (2009) Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325(5943):1001-1005.
- Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM & Corcoran LM (2015) The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15(3):160-171.
- Oak JS & Fruman DA (2007) Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in autoimmunity. *Autoimmunity* 40(6):433-441.
- Okkenhaug K (2013) Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 31:675-704.
- Onoda T, Rahman M, Nara H, Araki A, Makabe K, Tsumoto K, Kumagai I, Kudo T, Ishii N, Tanaka N, Sugamura K, Hayasaka K & Asao H (2007) Human CD4+ central and effector memory T cells produce IL-21: effect on cytokine-driven proliferation of CD4+ T cell subsets. *Int. Immunol.* 19(10):1191-1199.

- Ortega C, Fernandez AS, Carrillo JM, Romero P, Molina IJ, Moreno JC & Santamaria M (2009) IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J. Leukoc. Biol.* 86(2):435-443.
- Ostiguy V, Allard EL, Marquis M, Leignadier J & Labrecque N (2007) IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J. Leukoc. Biol.* 82(3):645-656.
- Ozaki K, Hishiya A, Hatanaka K, Nakajima H, Wang G, Hwu P, Kitamura T, Ozawa K, Leonard WJ & Nosaka T (2006) Overexpression of interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Hematol.* 84(3):224-230.
- Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR & Leonard WJ (2000) Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor β chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(21):11439-11444.
- Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, 3rd, Lipsky PE & Leonard WJ (2004) Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol.* 173(9):5361-5371.
- Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, Morse HC, Liu CY, Schwartzberg PL & Leonard WJ (2002) A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298(5598):1630-1634.
- Park-Min KH, Antoniv TT & Ivashkiv LB (2005) Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology* 210(2-4):77-86.
- Parks WC, Wilson CL & Lopez-Boado YS (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4(8):617-629.
- Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu WF, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Raymond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD & Foster D (2000) Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408(6808):57-63.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K & Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22(2):153-183.

- Peiser L, Gough PJ, Kodama T & Gordon S (2000) Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect. Immun.* 68(4):1953-1963.
- Pelletier M, Bouchard A & Girard D (2004a) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J. Immunol.* 173(12):7521-7530.
- Pelletier M, Bouchard A & Girard D (2004b) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J. Immunol.* 173(12):7521-7530.
- Pelletier M & Girard D (2007a) Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation. *ScientificWorldJournal* 7:1715-1735.
- Pelletier M & Girard D (2007b) Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation. *ScientificWorldJournal* 7:1715-1735.
- Pene J, Gauchat JF, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, Delwail A, Foster D, Lecron JC & Yssel H (2004) Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J. Immunol.* 172(9):5154-5157.
- Perez SA, Mahaira LG, Sotiropoulou PA, Gritzapis AD, Iliopoulou EG, Niarchos DK, Cacoullos NT, Kavalakis YG, Antsaklis AI, Sotiriadou NN, Baxevanis CN & Papamichail M (2006) Effect of IL-21 on NK cells derived from different umbilical cord blood populations. *Int. Immunol.* 18(1):49-58.
- Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR, Thompson RW, Urban JF, Cheever AW, Young DA, Collins M, Grusby MJ & Wynn TA (2006) The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *The Journal of Clinical Investigation* 116(7):2044-2055.
- Petrella TM, Tozer R, Belanger K, Savage KJ, Wong R, Smylie M, Kamel-Reid S, Tron V, Chen BE, Hunder NN, Hagerman L, Walsh W & Eisenhauer EA (2012) Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study. *J. Clin. Oncol.* 30(27):3396-3401.
- Pollard JW (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9(4):259-270.
- Prieto J, Eklund A & Patarroyo M (1994) Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell. Immunol.* 156(1):191-211.
- Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, Reynolds SL, Weaver CT, Roarty K, Serra R, Benveniste EN & Cong Y (2009) TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J. Immunol.* 183(1):97-105.

- Rahman M, Nara H, Onoda T, Araki A, Li J, Hoshino T & Asao H (2007) Cloning and characterization of an isoform of interleukin-21. *FEBS Lett.* 581(21):4001-4009.
- Rane SG & Reddy EP (2000) Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19(49):5662-5679.
- Rankin AL, Guay H, Herber D, Bertino SA, Duzanski TA, Carrier Y, Keegan S, Senices M, Stedman N, Ryan M, Bloom L, Medley Q, Collins M, Nickerson-Nutter C, Craft J, Young D & Dunussi-Joannopoulos K (2012) IL-21 receptor is required for the systemic accumulation of activated B and T lymphocytes in MRL/MpJ-Fas(lpr/lpr)/J mice. *J. Immunol.* 188(4):1656-1667.
- Ratthe C, Ennaciri J, Garces Goncalves DM, Chiasson S & Girard D (2009) Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. *Mediators Inflamm* 193970:10.
- Ratthe C, Pelletier M, Roberge CJ & Girard D (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(2):169-175.
- Ravetch JV & Bolland S (2001) IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-290.
- Ren Y, Silverstein RL, Allen J & Savill J (1995) CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* 181(5):1857-1862.
- Ronnblom L & Elkon KB (2010) Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6(6):339-347.
- Ross GD (2000) Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit. Rev. Immunol.* 20(3):197-222.
- Rothwell L, Hu T, Wu Z & Kaiser P (2012) Chicken interleukin-21 is costimulatory for T cells and blocks maturation of dendritic cells. *Dev. Comp. Immunol.* 36(2):475-482.
- Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A & Macdonald TT (2009) Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 58(12):1629-1636.
- Rückert R, Bulfone-Paus S & Brandt K (2008) Interleukin-21 stimulates antigen uptake, protease activity, survival and induction of CD4+ T cell proliferation by murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 151(3):487-495.
- Ryu JG, Lee J, Kim EK, Seo HB, Park JS, Lee SY, Moon YM, Yoo SH, Park YW, Park SH, Cho ML & Kim HY (2015) Treatment of IL-21R-Fc control autoimmune arthritis via suppression

- of STAT3 signal pathway mediated regulation of the Th17/Treg balance and plasma B cells. *Immunol. Lett.* 163(2):143-150.
- Salvi V, Vermi W, Cavani A, Lonardi S, Carbone T, Facchetti F, Bosisio D & Sozzani S (2017) IL-21 may promote Granzyme B-dependent NK/plasmacytoid dendritic cell functional interaction in cutaneous lupus erythematosus. *J. Invest. Dermatol.* 10.1016/j.jid.2017.03.016.
- Salzer E, Kansu A, Sic H, Májek P, Ikincioğullari A, Dogu FE, Prengemann NK, Santos-Valente E, Pickl WF, Bilic I, Ban SA, Kuloğlu Z, Demir AM, Ensari A, Colinge J, Rizzi M, Eibel H & Boztug K (2014) Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133(6):1651-1659.e1612.
- Sarra M, Monteleone I, Stolfi C, Fantini MC, Sileri P, Sica G, Tersigni R, Macdonald TT, Pallone F & Monteleone G (2010) Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 16(8):1332-1339.
- Sarra M, Pallone F & Monteleone G (2013) Interleukin-21 in chronic inflammatory diseases. *Biofactors* 10.1002/biof.1105.
- Sawalha AH, Kaufman KM, Kelly JA, Adler AJ, Aberle T, Kilpatrick J, Wakeland EK, Li QZ, Wandstrat AE, Karp DR, James JA, Merrill JT, Lipsky P & Harley JB (2008) Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 67(4):458-461.
- Schlegel RA, Krahling S, Callahan MK & Williamson P (1999) CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differ.* 6(6):583-592.
- Schmitz I, Schneider C, Frohlich A, Frebel H, Christ D, Leonard WJ, Sparwasser T, Oxenius A, Freigang S & Kopf M (2013) IL-21 restricts virus-driven Treg cell expansion in chronic LCMV infection. *PLoS Pathog.* 9(5):e1003362.
- Schneemann M & Schoeden G (2007) Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J. Leukoc. Biol.* 81(3):579; discussion 580.
- Schonbeck U, Mach F & Libby P (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J. Immunol.* 161(7):3340-3346.
- Sengupta N & MacDonald TT (2007) The role of matrix metalloproteinases in stromal/epithelial interactions in the gut. *Physiology (Bethesda)* 22:401-409.

- Serbina NV, Jia T, Hohl TM & Pamere EG (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.*, (Annual Review of Immunology: Vol 26. p 421-452.
- Shang XZ, Ma KY, Radewonuk J, Li J, Song XY, Griswold DE, Emmell E & Li L (2006) IgE isotype switch and IgE production are enhanced in IL-21-deficient but not IFN-gamma-deficient mice in a Th2-biased response. *Cell. Immunol.* 241(2):66-74.
- Shi C & Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11(11):762-774.
- Shortman K & Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2(3):151-161.
- Sivori S, Cantoni C, Parolini S, Marcenaro E, Conte R, Moretta L & Moretta A (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(12):3439-3447.
- Sonderegger I, Kisielow J, Meier R, King C & Kopf M (2008) IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* 38(7):1833-1838.
- Spolski R & Leonard WJ (2008a) Interleukin-21: Basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, (Annual Review of Immunology: Vol 26. p 57-79.
- Spolski R & Leonard WJ (2008b) The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 20(3):295-301.
- Spolski R & Leonard WJ (2014) Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13(5):379-395.
- Stathopoulos GP (2010) Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. *Anti-cancer drugs* 21(8):732-736.
- Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-296.
- Stepensky P, Keller B, Abuzaitoun O, Shaag A, Yaacov B, Unger S, Seidl M, Rizzi M, Weintraub M, Elpeleg O & Warnatz K (2015) Extending the clinical and immunological phenotype of human interleukin-21 receptor deficiency. *Haematologica* 100(2):e72-76.
- Stockinger B & Omenetti S (2017) The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10.1038/nri.2017.50.
- Stout RD, Jiang CC, Matta B, Tietzel I, Watkins SK & Suttles J (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol.* 175(1):342-349.
- Strengell M, Julkunen I & Matikainen S (2004) IFN-alpha regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells. *J. Leukocyte Biol.* 76(2):416-422.

- Strengell M, Lehtonen A, Matikainen S & Julkunen I (2006) IL-21 enhances SOCS gene expression and inhibits LPS-induced cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukocyte Biol.* 79(6):1279-1285.
- Strengell M, Matikainen S, Sirén J, Lehtonen A, Foster D, Julkunen I & Sareneva T (2003) IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN- γ Production in Human NK and T Cells. *The Journal of Immunology* 170(11):5464-5469.
- Strengell M, Sareneva T, Foster D, Julkunen I & Matikainen S (2002) IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J. Immunol.* 169(7):3600-3605.
- Stuart LM & Ezekowitz RAB (2005) Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity* 22(5):539-550.
- Sutherland AP, Joller N, Michaud M, Liu SM, Kuchroo VK & Grusby MJ (2013) IL-21 promotes CD8+ CTL activity via the transcription factor T-bet. *J. Immunol.* 190(8):3977-3984.
- Suto A, Wurster AL, Reiner SL & Grusby MJ (2006) IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J. Immunol.* 177(6):3721-3727.
- Suzuki T, Hashimoto S, Toyoda N, Nagai S, Yamazaki N, Dong HY, Sakai J, Yamashita T, Nukiwa T & Matsushima K (2000) Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood* 96(7):2584-2591.
- Takeda Y, Nara H, Araki A & Asao H (2014) Human peripheral neutrophils express functional IL-21 receptors. *Inflammation* 37(5):1521-1532.
- Tamagawa-Mineoka R, Kishida T, Mazda O & Katoh N (2011) IL-21 reduces immediate hypersensitivity reactions in mouse skin by suppressing mast cell activation or IgE production. *J. Invest. Dermatol.* 131(7):1513-1520.
- Tangye SG, Ma CS, Brink R & Deenick EK (2013) The good, the bad and the ugly [mdash] TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13(6):412-426.
- Tel J, Anguille S, Waterborg CE, Smits EL, Figdor CG & de Vries IJ (2014) Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends Immunol.* 35(1):38-46.
- Terrier B, Costedoat-Chalumeau N, Garrido M, Geri G, Rosenzweig M, Musset L, Klatzmann D, Saadoun D & Cacoub P (2012) Interleukin 21 correlates with T cell and B cell subset alterations in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 39(9):1819-1828.
- Thomas CA, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein SC & El Khoury J (2000) Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J. Exp. Med.* 191(1):147-156.

- Thompson JA, Curti BD, Redman BG, Bhatia S, Weber JS, Agarwala SS, Sievers EL, Hughes SD, DeVries TA & Hausman DF (2008) Phase I study of recombinant interleukin-21 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 26(12):2034-2039.
- Thompson JS, Hardin DL, Glass JF, Dziba J, Campion J & Brown SA (2016) The Inflammatory Cytokine IL-21 is Expressed by Splenic Neutrophils in Response to Transplantation of Allogeneic Cells. *SOJ Immunol* 4(1):1-9.
- Timmerman JM, Byrd JC, Andorsky DJ, Yamada RE, Kramer J, Muthusamy N, Hunder N & Pagel JM (2012) A phase I dose-finding trial of recombinant interleukin-21 and rituximab in relapsed and refractory low grade B-cell lymphoproliferative disorders. *Clin. Cancer Res.* 18(20):5752-5760.
- Toomey JA, Gays F, Foster D & Brooks CG (2003) Cytokine requirements for the growth and development of mouse NK cells in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 74(2):233-242.
- Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3(2):133-146.
- Tsokos GC (2011) Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 365(22):2110-2121.
- Tsytsikov VN, Yurovsky VV, Atamas SP, Alms WJ & White B (1996) Identification and characterization of two alternative splice variants of human interleukin-2. *J. Biol. Chem.* 271(38):23055-23060.
- Turksma AW, Bontkes HJ, Ruizendaal JJ, van den Heuvel H, Scholten KB, Santegoets SJ, de Gruijl TD, Meijer CJ & Hooijberg E (2013) Increased cytotoxic capacity of tumor antigen specific human T cells after in vitro stimulation with IL21 producing dendritic cells. *Hum. Immunol.* 74(5):506-513.
- Underhill DM & Goodridge HS (2012a) Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12(7):492-502.
- Underhill DM & Goodridge HS (2012b) Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12(7):492-502.
- Underhill DM & Ozinsky A (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20:825-852.
- Vallières F & Girard D (2017) Mechanism involved in interleukin-21-induced phagocytosis in human monocytes and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 187(2):294-303.
- Vallièrès F & Girard D (2013) IL-21 Enhances Phagocytosis in Mononuclear Phagocyte Cells: Identification of Spleen Tyrosine Kinase as a Novel Molecular Target of IL-21. *The Journal of Immunology* 190(6):2904-2912.

- Van Belle TL, Nierkens S, Arens R & von Herrath MG (2012) Interleukin-21 receptor-mediated signals control autoreactive T cell infiltration in pancreatic islets. *Immunity* 36(6):1060-1072.
- Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J & Opdenakker G (2000) Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96(8):2673-2681.
- van der Laan LJ, Dopp EA, Haworth R, Pikkarainen T, Kangas M, Elomaa O, Dijkstra CD, Gordon S, Tryggvason K & Kraal G (1999) Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J. Immunol.* 162(2):939-947.
- van Furth R & Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128(3):415-435.
- van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Barnardo MC, Bethel G, Holmes GK, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JR, Sanders DS, Howdle P, Swift J, Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R, Cardon LR, Deloukas P & Wijmenga C (2007) A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat. Genet.* 39(7):827-829.
- Vandivier RW, Fadok VA, Ogden CA, Hoffmann PR, Brain JD, Accurso FJ, Fisher JH, Greene KE & Henson PM (2002) Impaired Clearance of Apoptotic Cells From Cystic Fibrosis Airways. *Chest* 121(3 suppl):89S.
- Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, Vaporidi K & Tsatsanis C (2017) Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *J. Immunol.* 198(3):1006-1014.
- Vieira OV, Botelho RJ & Grinstein S (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 366(Pt 3):689-704.
- Villarino AV, Kanno Y & O'Shea JJ (2017) Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat. Immunol.* 18(4):374-384.
- Vines CM, Potter JW, Xu Y, Geahlen RL, Costello PS, Tybulewicz VL, Lowell CA, Chang PW, Gresham HD & Willman CL (2001) Inhibition of beta 2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity* 15(4):507-519.
- Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, Yu D, Domaschek H, Whittle B, Lambe T, Roberts IS, Copley RR, Bell JI, Cornall RJ & Goodnow CC (2005) A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435(7041):452-458.

- Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR & King C (2008) A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 29(1):127-137.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kaldein JR & Girkontaite I (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390(6658):350-351.
- Vudattu NK, Magalhaes I, Hoehn H, Pan D & Maeurer MJ (2009) Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes Immun.* 10(2):132-140.
- Wan CK, Li P, Spolski R, Oh J, Andraski AB, Du N, Yu ZX, Dillon CP, Green DR & Leonard WJ (2015) IL-21-mediated non-canonical pathway for IL-1beta production in conventional dendritic cells. *Nat. Commun.* 6:7988.
- Wan CK, Oh J, Li P, West EE, Wong EA, Andraski AB, Spolski R, Yu ZX, He J, Kelsall BL & Leonard WJ (2013) The Cytokines IL-21 and GM-CSF Have Opposing Regulatory Roles in the Apoptosis of Conventional Dendritic Cells. *Immunity* 38(3):514-527.
- Wang AV, Scholl PR & Geha RS (1994) Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc gamma RI) with the kinases Hck and Lyn. *J. Exp. Med.* 180(3):1165-1170.
- Wang G, Tschöi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, Kim G, Leonard WJ & Hwu P (2003) In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res.* 63(24):9016-9022.
- Wang LN, Cui YX, Ruge F & Jiang WG (2015) Interleukin 21 and Its Receptor Play a Role in Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. *Cancer Genomics Proteomics* 12(5):211-221.
- Wang N, Satoskar A, Faubion W, Howie D, Okamoto S, Feske S, Gullo C, Clarke K, Sosa MR, Sharpe AH & Terhorst C (2004) The Cell Surface Receptor SLAM Controls T Cell and Macrophage Functions. *J. Exp. Med.* 199 (9):1255-1264.
- Wang Y, Han CC, Cui D, Li Y, Ma Y & Wei W (2017) Is macrophage polarization important in rheumatoid arthritis? *Int. Immunopharmacol.* 50:345-352.
- Webb R, Merrill JT, Kelly JA, Sestak A, Kaufman KM, Langefeld CD, Ziegler J, Kimberly RP, Edberg JC, Ramsey-Goldman R, Petri M, Reveille JD, Alarcon GS, Vila LM, Alarcon-Riquelme ME, James JA, Gilkeson GS, Jacob CO, Moser KL, Gaffney PM, Vyse TJ, Nath SK, Lipsky P, Harley JB & Sawalha AH (2009) A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 60(8):2402-2407.
- Wei L, Laurence A, Elias KM & O'Shea JJ (2007) IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 282(48):34605-34610.

- Wendt K, Wilk E, Buyny S, Schmidt RE & Jacobs R (2007) Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology* 122(4):486-495.
- Wernersson S & Pejler G (2014) Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* 14(7):478-494.
- Williams P, Rafei M, Bouchentouf M, Raven J, Yuan S, Cuerquis J, Forner KA, Birman E & Galipeau J (2010) A Fusion of GM-CSF and IL-21 Initiates Hypersignaling Through the IL-21R alpha Chain With Immune Activating and Tumoricidal Effects In Vivo. *Mol. Ther.* 18(7):1293-1301.
- Wong CK, Wong PT, Tam LS, Li EK, Chen DP & Lam CW (2010) Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *J. Clin. Immunol.* 30(1):45-52.
- Wood N, Bourque K, Donaldson DD, Collins M, Vercelli D, Goldman SJ & Kasaian MT (2004) IL-21 effects on human IgE production in response to IL-4 or IL-13. *Cell. Immunol.* 231(1-2):133-145.
- Wright SD & Griffin FM, Jr. (1985) Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 38(2):327-339.
- Wu Z, Kim HP, Xue HH, Liu H, Zhao K & Leonard WJ (2005) Interleukin-21 receptor gene induction in human T cells is mediated by T-cell receptor-induced Sp1 activity. *Mol. Cell. Biol.* 25(22):9741-9752.
- Wurster AL, Rodgers VL, Satoskar AR, Whitters MJ, Young DA, Collins M & Grusby MJ (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. *J. Exp. Med.* 196(7):969-977.
- Wynn TA & Barron L (2010) Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.* 30(3):245-257.
- Wynn TA & Vannella KM (2016) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44(3):450-462.
- Xin G, Schauder DM, Lainez B, Weinstein JS, Dai Z, Chen Y, Esplugues E, Wen R, Wang D, Parish IA, Zajac AJ, Craft J & Cui W (2015) A Critical Role of IL-21-Induced BATF in Sustaining CD8-T-Cell-Mediated Chronic Viral Control. *Cell Rep* 13(6):1118-1124.
- Xing R, Jin Y, Sun L, Yang L, Li C, Li Z, Liu X & Zhao J (2016) Interleukin-21 induces migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 184(2):147-158.
- Xu M, Liu M, Du X, Li S, Li H, Li X, Li Y, Wang Y, Qin Z, Fu Y-X & Wang S (2015) Intratumoral Delivery of IL-21 Overcomes Anti-Her2/Neu Resistance through Shifting Tumor-

- Associated Macrophages from M2 to M1 Phenotype. *The Journal of Immunology* 194(10):4997-5006.
- Xu W, Narayanan P, Kang N, Clayton S, Ohne Y, Shi P, Herve MC, Balderas R, Picard C, Casanova JL, Gorvel JP, Oh S, Pascual V & Banchereau J (2014) Human plasma cells express granzyme B. *Eur. J. Immunol.* 44(1):275-284.
- Yamamoto-Furusho JK, Miranda-Perez E, Fonseca-Camarillo G, Sanchez-Munoz F, Barreto-Zuniga R & Dominguez-Lopez A (2010) Interleukin 21 expression is increased in rectal biopsies from patients with ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 16(7):1090.
- Yamanaka M, Eda S & Beppu M (2005) Carbohydrate chains and phosphatidylserine successively work as signals for apoptotic cell removal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328(1):273-280.
- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK & Hafler DA (2008) IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454(7202):350-352.
- Yi JS, Du M & Zajac AJ (2009) A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* 324(5934):1572-1576.
- Yoshimura A, Naka T & Kubo M (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7(6):454-465.
- Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ & Tedder TF (2012) Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 491(7423):264-268.
- Young DA, Hegen M, Ma HLM, Whitters MJ, Albert LM, Lowe L, Senices M, Wu PW, Sibley B, Leathurby Y, Brown TP, Nickerson-Nutter C, Keith JC & Collins M (2007) Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56(4):1152-1163.
- Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE & Leonard WJ (2007) The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood* 109(10):4135-4142.
- Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Brady JN, Restifo NP, Berzofsky JA & Leonard WJ (2005) Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *The Journal of Experimental Medicine* 201(1):139-148.
- Zhao CC, Gao XQ, Xue J, Cong Z, Zhang WL, Chen T, Wu FX, Xiong J, Ju B, Su A, Wei Q & Qin C (2013) Interleukin-21 up-regulates interleukin-21R expression and interferon gamma

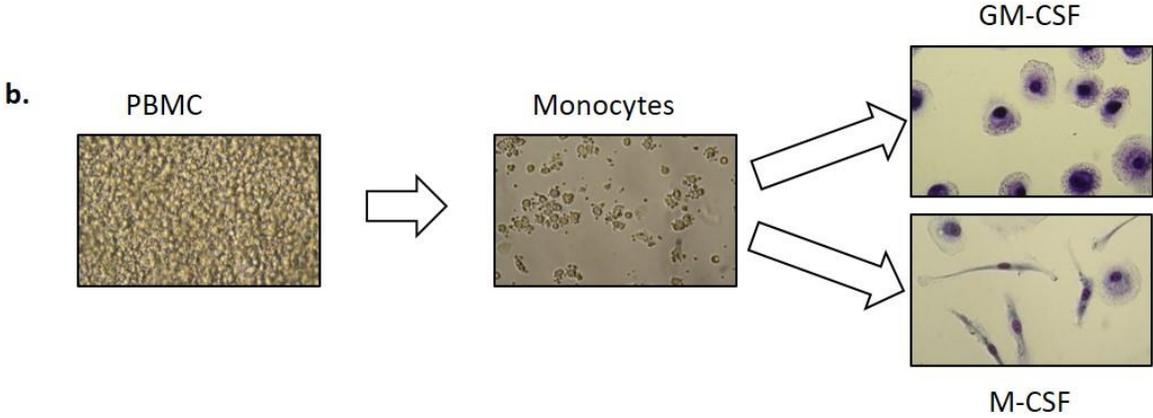
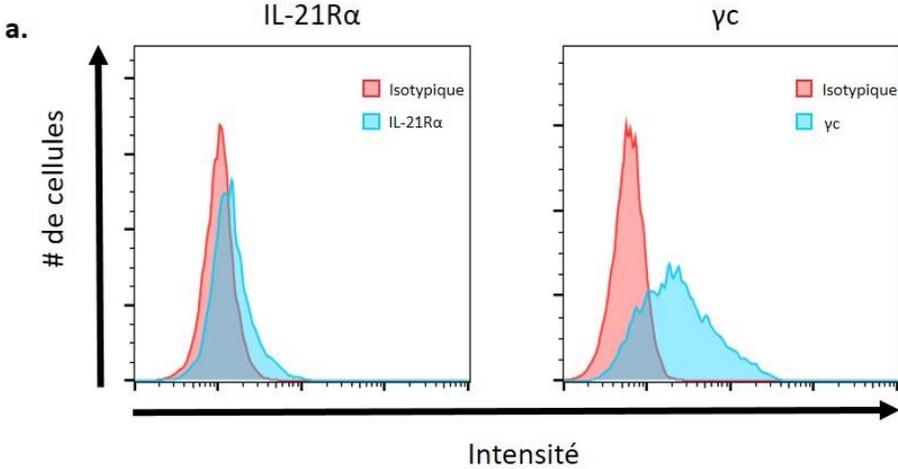
production by CD8+ cells in SHIV-infected macaques. *Exp Biol Med (Maywood)* 238(4):400-409.

Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ & Littman DR (2007) IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 8(9):967-974.

Ziegler-Heitbrock L (2014) Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol.* 289(1-2):135-139.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM & Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116(16):e74-80.

Annexe 1



F