



HAL
open science

Génération et analyse fonctionnelle d'antagonistes de l'oncostatine m et de l'interleukine-31, cytokines impliquées dans l'inflammation cutanée et le développement tumoral

Emilie Venereau

► **To cite this version:**

Emilie Venereau. Génération et analyse fonctionnelle d'antagonistes de l'oncostatine m et de l'interleukine-31, cytokines impliquées dans l'inflammation cutanée et le développement tumoral. Immunologie. Université d'Angers, 2008. Français. NNT : . tel-00445055

HAL Id: tel-00445055

<https://theses.hal.science/tel-00445055>

Submitted on 7 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE D'ANGERS

Année : 2008

N° d'ordre : 906

**GENERATION ET ANALYSE FONCTIONNELLE D'ANTAGONISTES DE
L'ONCOSTATINE M ET DE L'INTERLEUKINE-31, CYTOKINES IMPLIQUEES
DANS L'INFLAMMATION CUTANEE ET LE DEVELOPPEMENT TUMORAL**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Immunologie

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue à huit clos

Le mardi 24 Juin 2008

A 14h00

Par Emilie VENEREAU

Devant le jury ci-dessous :

Dr. Jean-Claude LECRON, Rapporteur, MCU-PH, EA 3806, Poitiers

Dr. Dominique HEYMANN, Rapporteur, MCU-PH, EA 3822, Nantes

Dr. Michel DY, Examineur, DR1 CNRS, UMR CNRS 8147, Paris

Dr. Michel SAMSON, Examineur, CR1 INSERM, INSERM U620, Rennes

Dr. Hugues GASCAN, Examineur, DR1 CNRS, INSERM U564, Angers

Directeur de thèse : Dr. Hugues GASCAN

Nom et coordonnées du laboratoire : INSERM U564, CHU

4, rue Larrey, Bâtiment Montclair

49933 ANGERS CEDEX 9

REMERCIEMENTS

Je remercie très sincèrement le Dr. Jean-Claude Lecron et le Dr. Dominique Heymann d'avoir accepté d'être rapporteurs dans mon jury et d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie également très sincèrement le Dr. Michel Dy et le Dr. Michel Samson d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineurs.

Je remercie Hugues de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans d'excellentes conditions, de la confiance qu'il m'a témoignée et de la qualité scientifique des projets qu'il m'a confiés. Merci également pour tous tes conseils, en particulier concernant mon avenir...

Je remercie particulièrement Sylvie pour sa patience, pour ses conseils et surtout pour ses corrections de dernière minute !!! Merci pour ton soutien et vive Eddy Mitchell !!!

Merci ma Zaza pour tout c'est-à-dire pour les manips, pour les fous rires, pour ton soutien, pour les barbec', pour les soirées, pour Center Parcs, pour les aprem dans la piscine, pour tes expressions dont tu es la seule à connaître la signification exacte, pour ta bonne humeur matinale à partir de 14 heures sans oublier tes « t'es con » !! Merci surtout pour ton amitié sincère, tu vas vraiment me manquer à Milan et je t'aime...

Merci à son cher et tendre, Loulou, pour toutes ces choses là également (à part les manips, quoique la PCR, ça te connaît maintenant) sans oublier pour la gazinière, pour le super film à Center Parcs et pour tous les coups de main. J'espère que l'on passera encore des tonnes de bons moments ensemble (vous avez intérêt à venir à Milan au moins tous les quinze jours !!!) et il va vraiment falloir arranger ce problème d'internet pour que l'on puisse se parler sur MSN !!

Merci à ma Bibine pour ton fou rire unique au monde, pour ta bonne humeur, pour ton soutien, pour nos discussions du soir (quand Seb s'énerve car je dois encore starver mes cellules !), pour ta gentillesse, pour cette belle amitié et surtout pour les journées IFR!!!!!!!!!!!!!! Je sais que nous sommes dorénavant liés pour la vie grâce à Boubou et Buffy... Merci à ma Titi pour ta joie de vivre, ton soutien, ta solidarité (bah oui te faire cramer une journée sur un bateau juste par solidarité pour moi, je dis merci Titi mais mets de la crème solaire à Djerba s'il te plaît !) et surtout pour les journées IFR!!!!!!!!!! Vous avez sacrément intérêt à venir nous voir à Milan et à m'inviter à vos thèses parce que je ne raterais ça pour rien au monde (si, peut-être pour un concert de Justin...).

Merci à mon futur moi, je sais que tu t'es reconnu Cath. Merci pour ta gentillesse, tes bons conseils (surtout concernant le bouchon muqueux...), ta philosophie de vie, toutes tes corrections, les chouquettes et surtout ne changes rien, on t'aime comme ça...

Merci à ma Dodo pour toutes ses années passées ensemble (et oui ça commence à faire pas mal de temps, on vieillit !!). Je sais que l'on restera toujours en contact mais ça va me manquer de ne plus se voir au quotidien. Merci pour ton soutien, tes conseils et surtout pour ton amitié. Je suis certaine que tout va bien se passer pour vous aux USA mais si tu changes d'avis, n'oublies pas que Seb ou moi on trouvera un arrangement pour que tu viennes travailler avec nous à Milan !!! Merci à Fabounet pour ton aide à la soumission des articles, pour tes coups de main en informatique et pour les fous rires que tu provoques régulièrement !!!

Merci à ma Isa pour ta gentillesse, ton écoute, tes conseils et ton amitié. Tu nous manques depuis que tu habites dans le trou du cul du monde mais je te fais totalement confiance pour venir nous rendre visite à Milan...et au final tu vois Angers, ce n'est pas si mal !!! Merci aussi à son chéri et vivement que votre petite famille s'agrandisse !!!

Merci à mamie Céline pour tous les fous rires, tes petites attentions, ta gentillesse, ta patience, ta passion communicative des chats, les super soirées passées ensemble et bien sûr pour ton amitié. C'est où Ténérife ? Et surtout merci pour toutes tes anecdotes qui nous font mourir de rire. J'espère que tu m'en racontera plein quand tu viendras faire du shopping avec moi à Milan. Merci aussi à Davidounet même si tu as tenté plusieurs attaques à l'orange contre moi !! Merci d'être le fournisseur officiel de costumes pour Sébastien. Rendez-vous à Milan également mais je pense que tu iras plutôt à San Siro avec Seb... et juste pour te faire plaisir : allez le stade Rennais !!!

Merci à ma purificatrice préférée, Linda, pour ton aide au quotidien, ta patience, ton écoute, tes conseils et ton amitié et merci aussi à ton chéri pour son super accueil quand on est arrivé au labo sans oublier les cours qu'il nous a donné !! Je vous souhaite plein de bonheur pour l'avenir (en particulier un petit chat !!!) et vous êtes évidemment les bienvenus à Milan !!

Merci aux professionnelles de la Q-PCR, j'ai nommé Laurence et Marie-hélène !! Merci pour votre aide, votre humour et votre gentillesse. Bonne continuation pour aggrandir le catalogue de primers...

*Merci à mes cowboys préférés pour le bisou et oui je l'ai eu mon bisou !!!
Merci Simon pour ton fond (mais si tu as un bon fond), les jogging avec ton micro short, ta gentillesse, les super soirées en ta compagnie et ton amitié. Viens nous voir à Milan ,elles sont belles les italiennes...Merci mon Juju, « ça faisait beaucoup de plaisir quand tu étais dans le labo ». Merci pour les discussions très instructives sur Emile Louis, ton humour, ta bonne humeur contagieuse et ton hyperactivité !! Tu nous manques énormément au labo...Merci à Maudélette aussi pour les super soirées passées ensemble, pour les conseils diététiques et pour son courage (et oui s'occuper de Juju au quotidien ça doit pas être facile !!). venez vite nous voir à Milan !!*

Merci à Mumu pour sa bonne humeur accompagnée d'un rire inégalable mais surtout merci d'avoir fait un bout de chou aussi craquant car ça va peut-être pouvoir enfin donner envie à mon poupout de faire des bébés !!! Et bien évidemment nous vous attendons toi, Nico et ton p'tit bout à Milan...

Merci à ma Juju et à mon Pierrot pour tout : votre générosité, votre joie de vivre et surtout pour nous avoir fait découvrir votre petit coin de paradis !! Vous êtes des personnes rares et précieuses, et je vous adore. Je vous fais bien évidemment confiance pour venir nous voir à Milan (Toulouse-Milan c'est presque comme Nantes-Angers !!). Venez vite sinon on va déprimer.

Merci à Fang de nous avoir invités à partager son bonheur lors de son mariage. Je te souhaite tout le bonheur du monde. Merci à notre pervers préféré : Yaya, merci de m'avoir entraîné pour les Italiens... Merci à François pour tes conseils et ta disponibilité. Merci à Sylvie A., notre Elvis Presley du labo (et oui avec Sylvie, c'est toujours le col relevé...) et bon courage avec tes filles !! Merci à Véro pour ta gentillesse et ton humour (continues à faire peur à Sylvie pour moi...). Merci à Patricia pour ta patience, ta disponibilité et ta générosité (surtout pour la nourriture) ! Merci à Céline, la dernière venue, je suis ravie d'avoir fait ta connaissance et j'espère que tu passeras d'aussi bons moments que moi dans ce labo. Merci à Josy pour ton aide et les pots pipi !!! Merci à Marie pour ta gentillesse et bon courage pour enlever tes cheveux dans la salle de bain !!! Merci à Yveline pour ta bonne humeur contagieuse et surtout pour ton rire, j'en suis fan !! Merci au gabonnais pour sa bonne humeur ! Merci à Rémy pour la délicieuse tarte au citron ! Merci à Patrice pour ta disponibilité et les manip avec les souris ! Merci à Pascale et surtout à Yves pour avoir supporté Sébastien... Merci à tous les petits stagiaires qui sont venus égayer le labo. Merci à l'étage du dessous en particulier Sabrina et Ulrich pour leur gentillesse et Laurent pour les bons moments passés avec lui le midi. Merci aussi à toute l'équipe du CPP.

Merci à tout le monde pour les super pauses du midi, ça va terriblement me manquer et vous allez tous me manquer...

Je n'oublie pas ceux qui sont déjà partis : Peggy (la montagne ça vous gagne), Caro (merci de m'avoir accompagnée dans mes débuts et vive les USA), Gersende (le FACS, ma vie, mon œuvre), Damien (et pour un paquet de chocos ?), Anne-Hélène (merci de m'avoir passé ton bureau...), Lena (je t'aime ma Lena, tu es vraiment une personne exceptionnelle et unique !!) et surtout ma Flo, tu nous manques trop !!!! On sera plus près pour venir te voir maintenant et je te fais confiance pour venir nous voir aussi!

Merci également à Katia et à Franck pour votre gentillesse et les super collaborations.

Merci à mon Rod et à ma Stéph pour leur compréhension. Désolé de ne pas donner de nouvelles plus souvent mais je pense fort à vous et je vous donne rendez-vous à Milan !!

Merci à mes parents, mes sœurs, mes beaux et ma grand-mère pour votre soutien, vos conseils et votre amour. Je vous dédie ce travail car sans vous rien de tout ça n'aurait été possible... Merci aussi à mes petits bouts, je vous aime de tout mon cœur. Merci pour tout. Merci à tout le reste de ma famille, je suis très fière

d'avoir une famille aussi formidable que vous ! Merci également à toute la famille de Sébastien pour m'avoir accueilli si chaleureusement ! Bien évidemment vous avez tous intérêt à venir nous voir à Milan !!

Merci aussi à tous mes petits compagnons de voyage : Buffy, Marine sans oublier Lilou, Elie et bien sûr ma pépette.

Et le plus important pour la fin : mon poupout !!!!! Merci pour ton soutien, les skrunch-skrunch, les bons petits plats et surtout pour tout ton amour... La vie est belle et sera toujours belle auprès de toi. Je t'aime...

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
Akt : « serine threonine protein kinase B »
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
CBD : « cytokine binding domain »
CD : « cluster designation »
CISS: “cold-induced sweating syndrome”
CLC : « cardiotrophin like cytokine »
CLF : « cytokine like factor »
CNTF : « ciliary neurotrophic factor »
CPA : cellule présentatrice d’antigène
CSF : « colony stimulating factor »
CT-1 : cardiotrophine 1
Da : dalton
EBI-3 : « Epstein Barr virus induced gene 3 »
EGF : « epidermal growth factor »
ELISA : « enzyme linked immunosorbant assay »
EPO : érythropoïétine
ERK : « extracellular regulated kinase »
ES : « embryonic stem »
Fas-L : Fas ligand
FGF : « fibroblast growth factor »
FnIII : fibronectine de type III
Gab1: Grb2-associated binder-1
G-CSF : « granulocyte colony stimulating factor »
GFAP : « glial fibrillary acidic protein »
GH : « growth hormone »
GM-CSF : « granulocyte macrophage colony stimulating factor »
gp : glycoprotéine
GPI : « glycosyl-phosphatidyl-inositol »
GPL : « gp130 like »
Grb2: growth factor receptor bound-protein
HCA : « hydrophobic cluster analysis »
HHV8 : « human herpes virus 8 »
ICAM : « intracellular adhesion molecule »
IFN : interféron
Ig like : « immunoglobulin like »
IL: interleukine
Jak : « Janus kinase »
Kd : constante de dissociation
KO : « knock out »
KS : « Kaposi’s sarcoma »
KSHV : « Kaposi’s sarcoma associated herpesvirus »
LIF: « leukemia inhibitory factor »
MAPK : « mitogen activated protein kinase »

MAPKK : « mitogen activated protein kinase kinase »
NGF : « nerve growth factor »
NK : « natural killer »
NP : « neuropoietin »
NPSA : « network protein sequence analysis »
OSM : oncostatine M
PBIL : pôle bioinformatique Lyonnais
PI3K : « phosphatidyl inositol 3 kinase »
PIAS : « protein inhibitory of activated STAT »
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PMA : « phorbol myristate acetate »
PRL : prolactine
R : récepteur
s : soluble
SH : « Src homology »
Shc : « SH2 and collagen homology domain containing protein »
SHP : « SH2 domain containing tyrosine phosphatase »
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SLA : sclérose latérale amyotrophique
SOCS : « suppressor of cytokine signaling »
SOS: Son of sevenless
STAT : « signal transducer and activator of transcription »
TCCR : « T cell cytokine receptor »
Th : « T helper »
TNF : « tumor necrosis factor »
TPO : thrombopoïétine
TRAIL : « tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand »
v : viral
VEGF : « vascular endothelial growth factor »
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
WSX-1 : « WSXWS type I cytokine receptor »
WSXWS : tryptophane-sérine-acide aminé quelconque-tryptophane-sérine

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Chapitre 1. Les cytokines de la famille de l'interleukine 6 et leurs récepteurs	6
1. Structure des cytokines et des récepteurs	6
1.1. Structure des cytokines	6
1.2. Structure des récepteurs de cytokines	7
1.3. Les sites d'interaction entre les cytokines et les récepteurs	9
1.3.1. Les sites d'interaction des cytokines avec leurs récepteurs	9
1.3.2. Les sites d'interaction des récepteurs avec les cytokines	10
2. Les membres de la famille de l'IL-6 et leurs récepteurs	11
2.1. L'interleukine 6	11
2.2. L'interleukine 6 virale	14
2.3. L'interleukine 11	15
2.4. La cardiotrophine 1	17
2.5. Le « ciliary neurotrophic factor »	18
2.6. Le « cardiotrophin like cytokine »	20
2.7. La « neuropoïétine »	22
2.8. Le « leukemia inhibitory factor »	22
2.9. L'oncostatine M	24
2.10. L'interleukine-31	26
2.11. L'interleukine 27	27
3. Les cytokines composites	29
4. Récapitulatif	31
Chapitre 2. Les cytokines de la famille de l'interleukine 6 et la signalisation intracellulaire	33
1. Les protéines de la famille des « Janus kinases »	34
2. Les protéines de la famille des « signal transducer and activator of transcription » (STATs)	36
3. Les protéines adaptatrices et la famille des « mitogen activated protein kinase »	38
4. Les protéines de la voie des « phosphatidyl inositol 3 kinase»	40
5. La régulation négative de la signalisation intracellulaire	41

5.1. Les « protein tyrosine phosphatases » (PTPs)	41
5.2. Les « protein inhibitory of activated STAT » (PIAS)	42
5.3. Les « suppressor of cytokine signaling » (SOCS)	43
5.4. Autres systèmes de modulation de la transduction du signal	44
Chapitre 3. Implication des cytokines de la famille de l'IL-6 dans des pathologies	46
1. Cytokines de la famille de l'IL-6 et système cutané	46
1.1. OSM et inflammation cutanée : implication dans le psoriasis	46
1.2. IL-31 et dermatite atopique	49
1.3. Implication des autres membres de la famille de l'IL-6 au niveau cutané	51
1.3.1. L'IL-6	51
1.3.2. Le LIF	52
1.3.3. L'IL-11	53
2. Cytokines de la famille de l'IL-6 et cancer	54
2.1. Les cytokines à activité pro-tumorale	54
2.1.1. L'IL-6	54
2.1.2. Le LIF	55
2.2. Les cytokines à propriétés anti-tumorales	57
2.2.1. L'IL-27	57
2.2.2. L'OSM	58
2.3. Implication des voies de signalisation cellulaire : STAT3, une cible pour le développement de traitements anti-cancéreux	61
3. Les thérapies anti-cytokines développées contre les membres de la famille de l'IL-6	62
3.1. Les anticorps : exemple du traitement de la polyarthrite rhumatoïde par un anticorps anti-IL-6Rα	63
3.2. Les formes solubles des récepteurs	64
3.2.1. Agonistes ou antagonistes « naturels » ?	64
3.2.2. Une nouvelle génération d'antagonistes de cytokines : les « cytokine-traps »	65
OBJECTIFS	68
RESULTATS	71

<i>Article 1</i>	
<i>Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M/interleukin-31 shared receptor</i>	72
1. Récepteurs solubles de cytokines	72
2. Identification et activités biologiques de l'OSMR β soluble (OSMRs)	72
3. Génération et analyse fonctionnelle d'un antagoniste de l'OSM	74
<i>Résultats complémentaires: étude fonctionnelle de l'antagoniste de l'OSM</i>	76
<i>Article 2</i>	
<i>Definition and characterization of an inhibitor for interleukin-31</i>	79
1. Génération et caractérisation de l'antagoniste de l'IL-31	79
2. Mise en évidence de la spécificité de l'antagoniste	80
3. Activités biologiques de l'antagoniste	80
<i>Article 3</i>	
<i>Molecular cloning and characterization of rat interleukin-31</i>	82
1. Identification et clonage de l'IL-31 de rat	82
2. Recherche de cellules cibles pour l'IL-31 de rat	83
3. Activités biologiques de l'IL-31 de rat	84
<i>Article 4</i>	
<i>Activation of Stat4 by OSM and IL-31: critical role in tumoral cell proliferation</i>	85
1. Distribution tissulaire de STAT4	85
2. L'OSM et l'IL-31 recrute STAT4 dans des lignées de glioblastomes	86
3. GPL induit l'activation de STAT3 et de STAT4 par l'intermédiaire de différentes tyrosines cytoplasmiques	87
4. L'OSM et l'IL-31 induisent un effet cytostatique sur les lignées de glioblastome : implication de la voie STAT4	88
<i>DISCUSSION</i>	91
1. OSM et IL-31 : deux cytokines à tropisme cutané ?	92
2. Génération et analyse fonctionnelle des antagonistes de l'OSM et de l'IL-31	98
3. Effets cytostatiques de l'OSM et de l'IL-31 : implication de la voie de signalisation STAT4 ?	103
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	110

<i>ANNEXES</i>	137
<i>Article 1</i>	
<i>Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation</i>	138
1. Effets pro-inflammatoires de l'OSM sur les kératinocytes	138
2. Implication de l'OSM et de son récepteur de type II dans le psoriasis	139
<i>Article 2</i>	
<i>Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes</i>	140
1. Identification et caractérisation des cellules Th17 infiltrant les tissus inflammés	140
2. Les cellules Th1 et Th17 induisent des profils d'expression génique différents sur des kératinocytes inflammatoires	141

INTRODUCTION

L'échange d'informations entre les cellules est essentiel pour maintenir l'équilibre entre les différents systèmes en particulier les systèmes immunologique, hématologique et nerveux. La communication intercellulaire permet de coordonner la croissance, la différenciation, la prolifération, le métabolisme et les fonctions effectrices des cellules de différents organes, ou tissus, chez les organismes pluricellulaires. L'échange de ces informations se fait par contact direct entre les cellules via des molécules d'adhésion exprimées à leur surface ou par l'intermédiaire des médiateurs solubles de différentes natures, permettant ainsi aux cellules de communiquer à distance. Il peut s'agir notamment d'hormones, de cytokines ou de neurotransmetteurs et leur mode d'action peut être paracrine, autocrine ou endocrine.

Les cytokines jouent un rôle important dans la communication entre les cellules d'un organisme pluricellulaire. Ces médiateurs intercellulaires, qui agissent à des concentrations de l'ordre du picomolaire ou du nanomolaire, interviennent surtout dans la régulation de l'immunité, de l'hématopoïèse et lors de l'inflammation. Certaines ont aussi des actions au niveau du système nerveux. Ces protéines solubles de faible masse moléculaire, 10 à 50 kDa, peuvent être stabilisées par des N- et/ou O-glycosylations ainsi que par des ponts disulfures intracaténaux. Elles sont rapidement synthétisées et secrétées par les cellules. Leur durée de vie est courte *in vivo* et par conséquent elles agissent le plus souvent par un mode paracrine ou autocrine. La plupart des cytokines sont difficiles à détecter dans le sérum, car les cellules qui les produisent sont adjacentes aux cellules cibles et, le plus souvent, une très faible quantité de cytokine est libérée dans le milieu extracellulaire. Les cytokines se caractérisent souvent par leur pléiotropie, agissant sur différents types cellulaires, et par leur redondance fonctionnelle en exerçant des effets identiques sur une même cellule.

La famille des cytokines comprend de nombreuses molécules. Les principales sont les suivantes : les Interleukines (IL), protéines d'échange d'information entre les cellules du système immunitaire ; les interférons (IFN) de type I et de type II ; les « Colony Stimulating Factor » (CSF), qui contrôlent la différenciation et la prolifération des cellules souches et des précurseurs hématopoïétiques ; et les facteurs de nécrose comprenant les « tumor necrosis factor » (TNF) α et β , identifiés pour leurs propriétés lymphotoxique et inflammatoire.

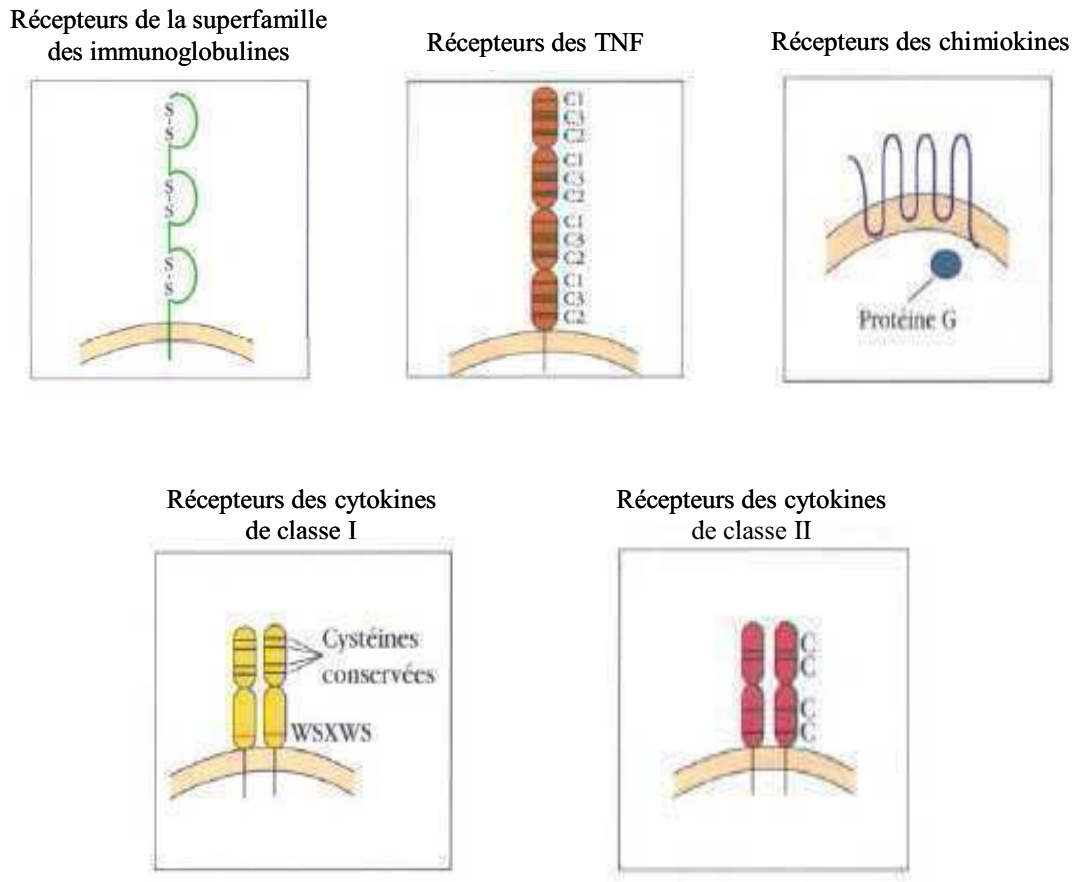
Les cytokines peuvent être classées en différentes familles selon leur structure tridimensionnelle. En effet, même si ces molécules possèdent peu d'homologie dans leur structure primaire, à l'inverse elles ont une structure tertiaire très proche. Des études de Fernando Bazan, par alignement de séquences, ont montré des homologies dans la structure

secondaire de certaines cytokines. Elles possèdent une structure en quatre hélices α disposées de façon antiparallèles deux à deux (1, 2). Les cytokines possédant cette structure ont été classées en deux sous-groupes en fonction de la longueur des hélices. Tout d'abord, certaines présentent des hélices α courtes comme l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-13, l'IL-15 et le « Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor » (GM-CSF). Au contraire, d'autres possèdent de longues hélices α . Il s'agit de l'IL-6, l'IL-11, l'IL-12, le « Granulocyte Colony Stimulating Factor » (G-CSF), l'érythropoïétine (EPO), la thrombopoïétine (TPO), l'hormone de croissance (GH), la prolactine (PRL), le « Leukemia Inhibitory Factor » (LIF), le « Ciliary Neurotrophic Factor » (CNTF), l'Oncostatine M (OSM), la Cardiotrophine 1 (CT-1), le « Cardiotrophin Like Cytokine » (CLC), la Neuropoïétine (NP) et le « Growth Promoting Activity factor » (GPA) Pour certaines cytokines, les structures tridimensionnelles prédites ont été confirmées par des études cristallographiques (GH, EPO, G-CSF, IL-6, LIF, CNTF, OSM) (3-8).

Aujourd'hui, les cytokines sont généralement classées selon les récepteurs avec lesquels elles interagissent. Elles agissent sur leurs cellules cibles en se fixant sur la partie extracellulaire de récepteurs membranaires spécifiques. Leurs récepteurs sont, en général, multimériques et certaines sous-unités réceptrices, les chaînes transductrices, possèdent un domaine cytoplasmique. A la suite de la fixation d'une cytokine, une réponse cellulaire est initiée grâce aux voies de signalisation intracellulaire induisant ainsi la transcription de gènes cibles. Les récepteurs de cytokines existent sous forme membranaire mais peuvent également exister sous forme soluble. Ces récepteurs solubles résultent, d'un clivage d'une liaison GPI grâce à l'action de la phospholipase C, d'un épissage alternatif ou d'une protéolyse limitée de la molécule.

L'identification des récepteurs a permis de définir différents groupes selon leur structure et/ou leurs activités biologiques (Figure 1). On peut distinguer la superfamille des immunoglobulines (récepteur du « Platelet Derived Growth Factor » (PDGF), de l'« Epidermal Growth Factor » (EGF), du « Macrophage Colony Stimulating Factor » (M-CSF) et du « Stem Cell Factor » (SCF) par exemple), les récepteurs de la famille du « Tumor Necrosis Factor » (TNF, NGF, CD-40, Fas-ligand, TRAIL), les récepteurs de chimiokines, les récepteurs de cytokines de classe II (IFN α , IFN β , IFN γ , IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26), et les récepteurs de cytokines de classe I. Ces derniers comprennent les récepteurs de l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-11, l'IL-12, l'IL-13, l'IL-15, l'IL-21, l'IL-23, l'IL-27, l'IL-31, de « Thymic Stromal Lymphopoietin » (TSLP), du G-CSF, du GM-

CSF, de la GH, de l'EPO, de la TPO, de la PRL, de la leptine, du LIF, du CNTF, de l'OSM, de la CT-1, de CLC et de la NP.



**Figure 1 : Schéma des récepteurs de cytokines
(Modifié d'après Immunologie-Kuby)**

Ce dernier groupe de récepteurs est appelé superfamille des récepteurs de cytokines ou récepteurs de type I. Les récepteurs de cette famille ont des caractéristiques structurales communes, ce sont des chaînes polypeptidiques à un seul domaine transmembranaire avec une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (1). La région extracellulaire contient un domaine appelé domaine de liaison de la cytokine ou « cytokine binding domain » (CBD) caractérisé par quatre cystéines en positions conservées en N-terminal et par un motif tryptophane-sérine-acide aminé quelconque-tryptophane-sérine (WSXWS) en C-terminal de ce domaine. Ces récepteurs sont glycosylés et ils sont le plus souvent multimériques. Ils ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque et requièrent, par conséquent, des protéines kinases intracellulaires pour la transduction du signal. Afin d'initier un signal, une cytokine peut se fixer, d'une part, à une petite chaîne

réceptrice spécifique à court domaine intracellulaire dite chaîne α . Ce complexe recrute ensuite un homodimère ou un hétérodimère de sous-unités appelées « chaînes β », à long domaine intracellulaire, capable d'être phosphorylées et d'assurer ainsi la transduction du signal. Les chaînes α sont liées à la membrane par un domaine transmembranaire suivi d'un court domaine intracellulaire, ou par un lien « Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol » (GPI). D'autre part, les cytokines peuvent aussi se fixer directement sur une chaîne β et ce complexe recrute ensuite une deuxième chaîne β . Les chaînes β , chaînes de transduction du signal peuvent être communes à plusieurs cytokines et cette caractéristique permet de définir des sous-familles dans ce groupe de cytokines. Ainsi, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15, l'IL-21 partagent une sous-unité appelée γ_c . L'IL-4 et l'IL-13 partagent le récepteur de l'IL-4 (IL-4R) ; l'IL-7 et TSLP partagent le récepteur IL-7R. De la même façon, l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF ont en commun la sous-unité β_c . L'IL-12 et l'IL-23 partagent une chaîne de transduction appelée IL-12R β_1 . Enfin, l'IL-6, l'IL-6 virale (IL-6v), l'IL-11, le LIF, le CNTF, l'OSM, la CT-1, le CLC, la NP et l'IL-27 partagent la chaîne de transduction gp130 définissant ainsi les cytokines de la famille de l'IL-6.

Chapitre 1

Les cytokines de la famille de l'interleukine 6 et leurs récepteurs

1. Structure des cytokines et des récepteurs

1.1. Structure des cytokines

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont aujourd'hui au nombre de onze, il s'agit de l'IL-6, de l'IL-6v, du LIF, de l'IL-11, du CNTF, de l'OSM, de la CT-1, du CLC, de l'IL-27, de la NP et de l'IL-31. Si ces cytokines ne présentent qu'environ 15 à 20% d'homologie entre elles dans leur structure primaire, elles ont à l'inverse une structure tertiaire très proche. Elles s'organisent en quatre hélices α antiparallèles deux à deux (1). Les deux premières hélices, nommées respectivement A et B, sont reliées par une longue boucle AB, et les hélices B et C, reliées par une courte boucle BC, sont ainsi disposées de façon antiparallèle. Puis l'hélice C est liée à l'hélice D par une longue boucle CD, permettant alors aux hélices A et D d'être elles aussi antiparallèles (figure 2).

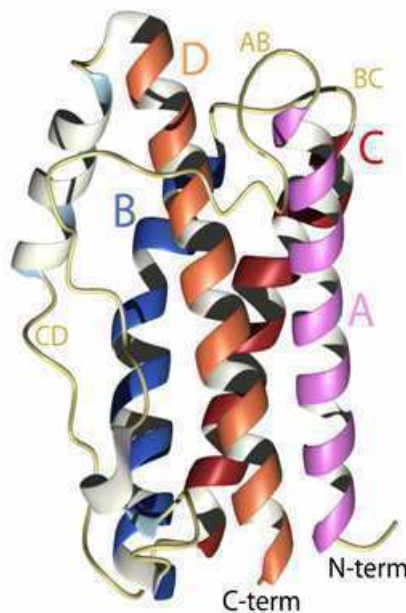


Figure 2 : Structure tridimensionnelle en ruban de l'IL-6.

Cette structure a été confirmée par cristallographie pour quatre cytokines : l'IL-6, le LIF, le CNTF et l'OSM (figure 3) (5-8).

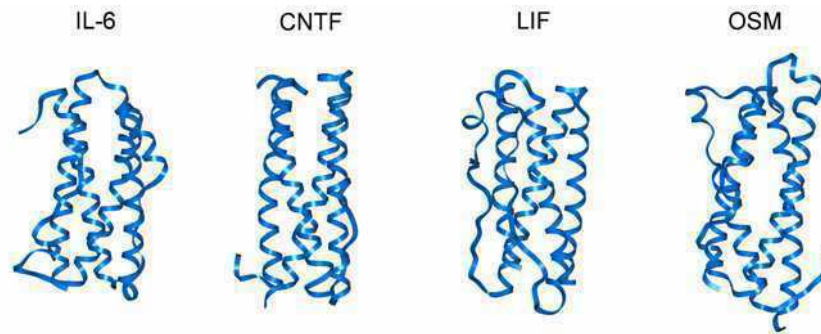


Figure 3 : Représentation en ruban des structures cristallographiques de l'IL-6, du CNTF, du LIF et de l'OSM.

1.2. Structure des récepteurs de cytokines

Les cytokines se fixent sur leurs récepteurs de façon spécifique et avec une haute affinité. Les récepteurs sont des complexes multimériques et trois modèles sont décrits. Le premier est l'homodimérisation de chaînes réceptrices (IL-6v). Le deuxième est l'hétérodimérisation des unités réceptrices (LIF, OSM, IL-31, CT-1, IL-27). Le troisième cas, la trimérisation des récepteurs est le plus fréquent (IL-6, IL-11, CNTF, CLC, NP). Il s'agit d'un complexe formé d'une cytokine et d'une chaîne α qui recrute ensuite un homodimère ou un hétérodimère de chaînes réceptrices.

Les récepteurs de cytokines appartiennent aux récepteurs de classe I. En effet, leur extrémité N-terminale est extracellulaire, ils possèdent un domaine transmembranaire de 20 à 30 aminoacides, à l'exception du CNTFR qui est ancré dans la membrane plasmique par un lien « glycosyl-phosphatidyl-inositol » (GPI). Leur extrémité C-terminale est par conséquent intracellulaire. Les récepteurs de cytokines sont composés de différents domaines extracellulaires aussi appelés modules. La région extracellulaire des récepteurs s'organise en domaines de type fibronectine de type III (FnIII), composés de sept feuillets β repliés les uns sur les autres par groupes de trois ou quatre, comme cela est indiqué pour gp130 dans la figure 4.

Au niveau extracellulaire, trois domaines peuvent être définis : les modules de fixation de la cytokine ou « cytokine binding domain » (CBD), les domaines de type « immunoglobuline like » (« Ig like ») et les domaines de type FnIII. Le CBD est composé de deux domaines de type FnIII : le premier N-terminal (domaine D2) comporte quatre résidus cystéine en positions conservées pouvant former des ponts disulfures et le second en C-terminal (domaine D3) contient un motif consensus caractéristique (WSXWS). Le domaine de type « Ig like » (domaine D1) correspondant également à un domaine de type FnIII, est

nommé ainsi en raison de ses homologies avec les régions constantes des immunoglobulines. Dans la région proximale à la membrane plasmique, certains récepteurs de cytokines présentent trois domaines de type FnIII (Figure 5).

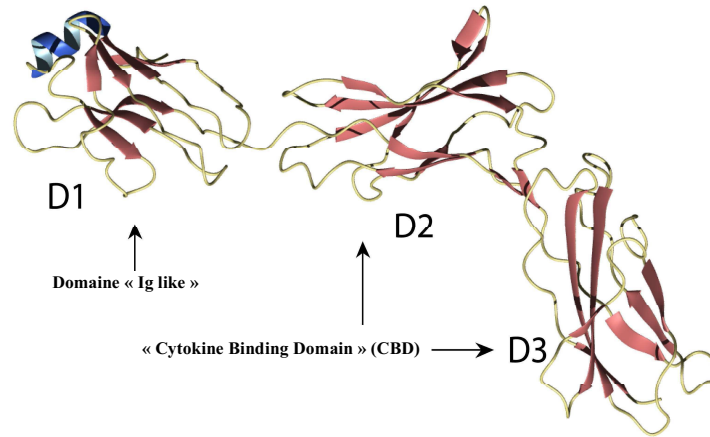


Figure 4 : Structure des domaines « Ig-like » et CBD de gp130

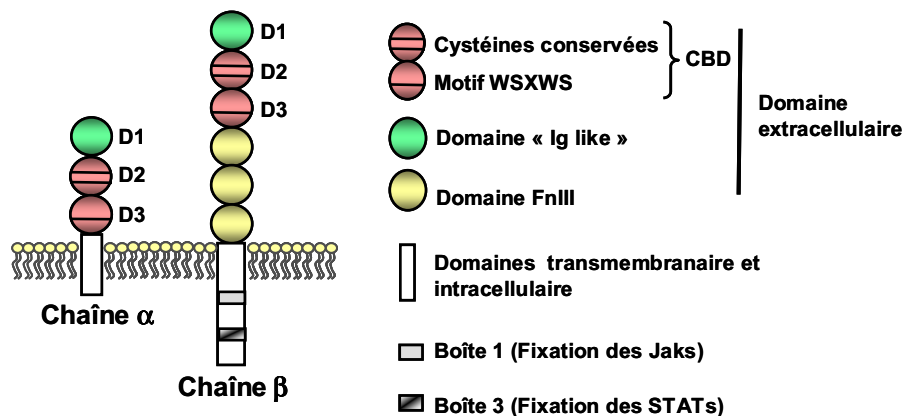


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des chaînes réceptrices des cytokines.

La région intracellulaire ne présente pas de structure conservée et est plus ou moins longue selon les chaînes réceptrices. Elle est très courte pour les chaînes α , environ 80 acides aminés, et ne possède pas de motif fonctionnel connu pouvant permettre la transduction intracellulaire du signal. Les autres chaînes, appelées chaînes β , présentent un domaine intracellulaire beaucoup plus long contenant des motifs fonctionnels conservés, appelés boîtes. Ces dernières sont reconnues par des protéines intracellulaires à activité tyrosine kinase, permettant ainsi la transduction du signal au niveau intracellulaire.

1.3. Les sites d'interaction entre les cytokines et les récepteurs

La formation de complexes protéiques ligands/récepteurs est la première étape nécessaire à l'activation du signal intracellulaire. Les sites d'interaction entre les cytokines et leurs récepteurs sont aujourd'hui bien définis.

1.3.1. Les sites d'interaction des cytokines avec leurs récepteurs

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont constituées de quatre hélices α antiparallèles deux à deux. En 1992, la cristallographie du complexe GH/GHR a permis de définir les sites d'interaction d'un ligand avec ses chaînes réceptrices (3) et des travaux de mutagenèse extensive ont été effectués sur ce complexe (9, 10). Deux sites d'interaction ont pu être identifiés sur l'hormone de croissance, et chaque site se lie à une des deux chaînes réceptrices. Le premier site (site I) est composé d'acides aminés de l'hélice D, de l'hélice A et de la boucle AB. Le second site (site II) est formé de résidus des hélices A et C.

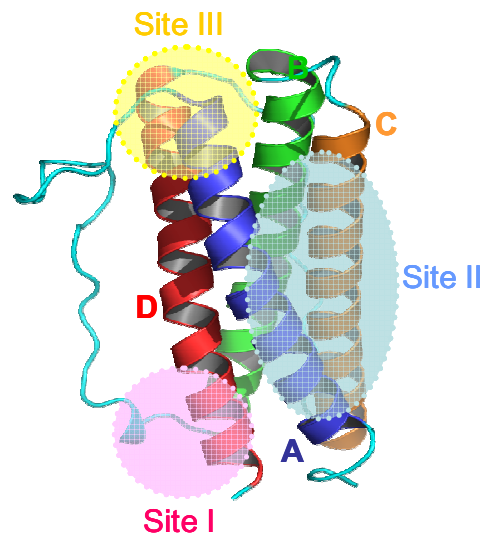


Figure 6 : Localisation des sites d'interactions potentiels d'une cytokine de la famille de l'IL-6 avec son récepteur

Des études de mutagenèse dirigée ont mis en évidence, dans les cytokines de la famille de l'IL-6, trois sites d'interaction avec les chaînes réceptrices (Figure 6). Les sites I et II, définis par analogie avec le complexe GH/GHR, sont également constitués de résidus appartenant à la boucle AB, à l'extrémité de l'hélice D et aux hélices A et C respectivement. De plus, un troisième site (site III) a été identifié sur les cytokines de la famille de l'IL-6, localisé à l'extrémité N-terminale de l'hélice D. Ce site est engagé dans l'interaction de la

cytokine avec une chaîne β . Les études de prédiction de structure par modélisation moléculaire confortées par des études de mutagenèse dirigée ont montré que le ligand interagit avec son récepteur α par l'intermédiaire de quelques résidus spécifiques, proches dans la structure tridimensionnelle de la molécule. Ainsi, les cytokines telles que le LIF, l'OSM, la CT-1 et le CNTF, interagissent avec le LIFR par un motif conservé constitué d'une phénylalanine et d'une lysine distantes de deux résidus dans la séquence primaire. Ce motif FXXK est situé au niveau du site III (11-13). Les résidus du site I, impliqués dans l'interaction de la cytokine avec le récepteur α , ont été définis pour l'IL-6, l'IL-11, le CNTF et le CLC (14-16).

1.3.2. Les sites d'interaction des récepteurs avec les cytokines

Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 sont constitués de domaines conservés dans leur partie extracellulaire et, en particulier, du domaine « de fixation de la cytokine », le CBD (1). Ce dernier est formé de deux domaines de type FnIII. Le domaine N-terminal présente quatre cystéines, en positions conservées, permettant la formation de ponts disulfures. Le domaine C-terminal possède le motif caractéristique WSXWS, souvent utilisé pour identifier de nouveaux récepteurs de cytokines comme par exemple le CLF (17). Comme son nom l'indique, le CBD est connu pour interagir avec la cytokine. En effet, les régions impliquées dans l'interaction GHR/GH sont situées dans le CBD et plus précisément dans les boucles proches de la région charnière entre les deux régions du CBD (3). Des études de mutagenèse dirigée montrent que l'interaction de gp130 avec le site II du ligand se fait par un nombre limité de résidus, éloignés dans la structure primaire, mais proches dans la structure tridimensionnelle de la chaîne (18, 19). Le deuxième domaine conservé des récepteurs impliqué dans la fixation du ligand est le domaine « Ig like ». Il est impliqué dans l'interaction du récepteur avec le site III de la cytokine. Pour exemple, la cristallographie du complexe IL-6v/gp130 en solution montre que le complexe est tétramérique 2:2 et que chaque molécule de gp130 interagit avec le site II de l'IL-6v par l'intermédiaire de son CBD et avec le site III de la cytokine via son domaine « Ig like » (20). Des résultats similaires ont été obtenus pour le complexe G-CSF/G-CSFR après des études de mutagenèse dirigée (21). De même, nous avons démontré l'implication du domaine « Ig like » du LIFR dans la fixation du LIF et de la CT-1 mais également, de manière moins importante, dans la fixation de l'OSM qui interagit en premier avec gp130 (13).

Il semble donc que le domaine « Ig like » et le CBD définissent les sites d'interaction entre les chaînes réceptrices et les ligands. Les sites I, II et III sont en fait des interfaces entre la cytokine et son récepteur. Cependant, d'autres sites, tels que les sites IIb et IIIb, ont été définis et permettent des interactions entre les chaînes réceptrices. Leur implication a également été mise en évidence dans la formation du complexe cytokine/récepteur (22) (Figure 7).

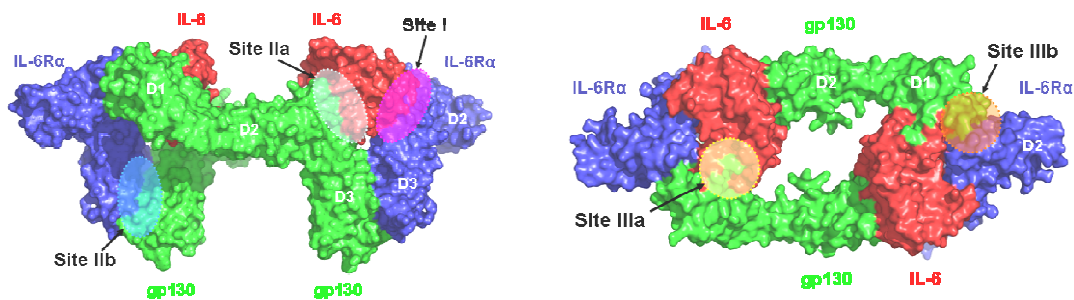


Figure 7 : Localisation des sites d'interaction du complexe IL-6/récepteur de l'IL-6.

2. Les membres de la famille de l'IL-6 et leurs récepteurs

2.1. L'interleukine 6

Weissenbach décrit en 1980, l'IFN β 2 comme capable de protéger des fibroblastes en culture contre une infection virale (23). En 1985, une protéine nommée « B-cell stimulatory factor 2 » (BSF-2) est isolée pour sa capacité à induire la sécrétion des immunoglobulines par les lymphocytes B (24). Dans les deux cas, il s'agit de l'IL-6, dont le gène humain est situé sur le chromosome 7. Cette cytokine de 26 kDa est produite par les lymphocytes B et T, les macrophages, les cellules stromales de la moelle osseuse, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules du mésenchyme, ainsi que par les astrocytes et les cellules endothéliales.

Ses activités sont multifonctionnelles puisqu'elle intervient aussi bien au niveau des systèmes immunitaire et nerveux que dans l'hématopoïèse, dans la régulation de l'inflammation ou le remodelage osseux. En effet, elle est capable d'augmenter la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B et active les lymphocytes T en augmentant leur capacité lytique vis-à-vis de certains antigènes (25). Elle constitue un cofacteur des cellules hématopoïétiques, agissant en synergie avec l'IL-3 et le GM-CSF, pour augmenter le potentiel prolifératif des précurseurs hématopoïétiques (26). L'IL-6 peut agir à différents niveaux du

système nerveux, induisant, par exemple, la différenciation de neuroblastomes *in vivo* (27), ou favorisant la survie et la prolifération de glioblastomes. Au niveau des cellules hépatiques, elle agit comme un puissant activateur des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (haptoglobine et fibrinogène) (28). Au niveau osseux, elle est capable d'induire la différenciation de précurseurs hématopoïétiques vers un phénotype d'ostéoclastes, afin de favoriser la résorption osseuse (29) (Figure 8).

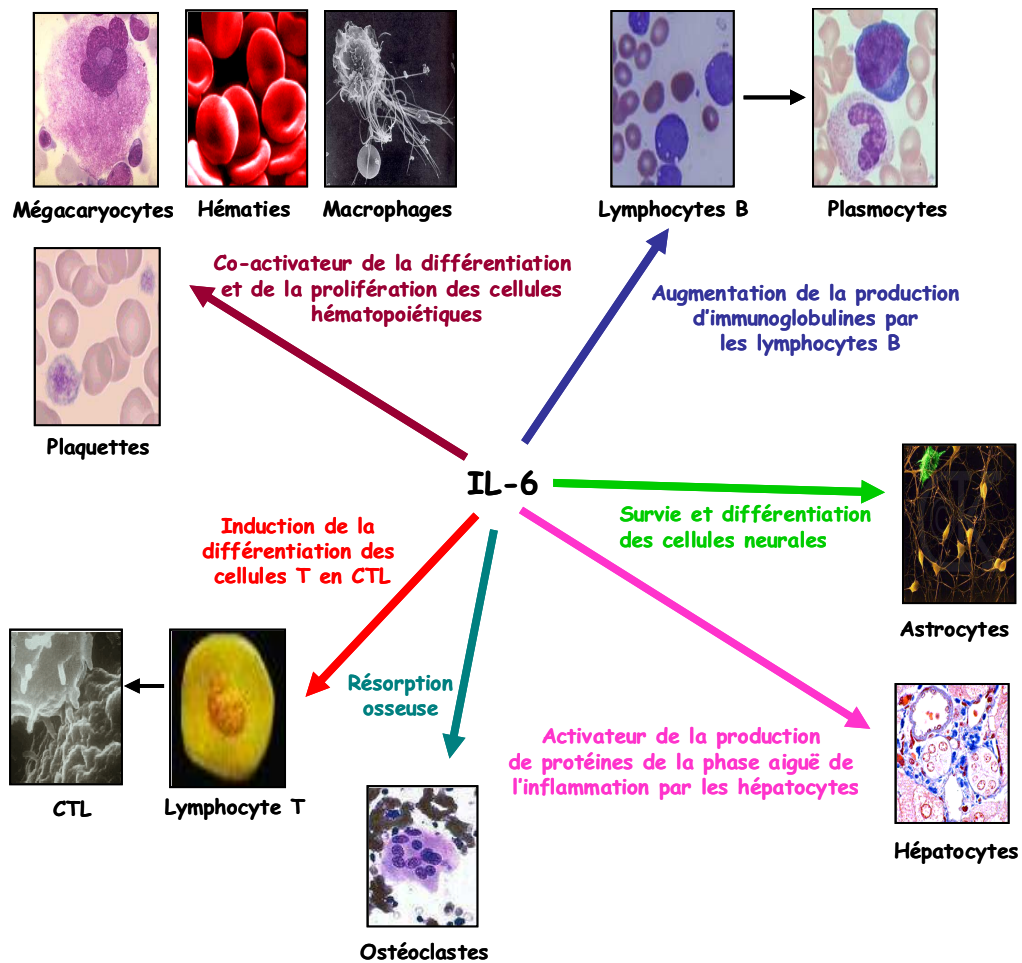


Figure 8 : Activités biologiques pléiotropes de l'IL-6.

Les expériences d'inactivation ou de surexpression du gène de l'IL-6 ont confirmé l'importance des fonctions biologiques de cette cytokine *in vivo*. Son absence, induite chez des souris, entraîne une déficience de la réponse immunitaire humorale, une diminution de l'activation hépatocytaire inflammatoire à la suite d'une infection ou d'une lésion tissulaire (30), ainsi qu'une absence de remodelage osseux après ovariectomie (31). A l'opposé, les souris surexprimant l'IL-6 produisent une quantité importante de protéines de la phase aiguë de l'inflammation et développent une plasmacytose importante (32, 33).

Afin d'exercer ses effets biologiques, l'IL-6 se fixe sur la chaîne IL-6R α avec une affinité modérée ($K_d=10^{-9}M$). Cette chaîne réceptrice est une glycoprotéine de 80 kDa, encore appelée gp80 (34), dont l'expression est restreinte aux leukocytes et aux hépatocytes. Le gène codant pour cette protéine humaine se trouve sur le chromosome 1. Sa partie extracellulaire est composée en N-terminal d'un domaine de type « Ig like », puis d'un domaine CBD et de trois domaines FnIII. Le domaine « Ig like » ne semble pas être impliqué dans la fixation de la cytokine, puisque la délétion de cette région n'entraîne pas de modification de l'interaction entre l'IL-6 et son récepteur (35). Ensuite, le domaine transmembranaire est suivi d'une courte région intracellulaire de 82 acides aminés. Ces deux dernières régions ne sont pas nécessaires à la transduction du signal initié par l'IL-6, puisque le récepteur soluble sIL-6R α est capable de remplacer la chaîne membranaire (36). Cette forme soluble naturelle de l'IL-6R α fixe l'IL-6 avec la même affinité que la forme membranaire. Ce complexe IL-6/sIL-6R α est capable d'induire une signalisation dans des cellules exprimant uniquement gp130 à la membrane : ce phénomène est appelé « transsignalisation » (37, 38). Etant donné l'expression restreinte de l'IL-6R α , ce phénomène augmente considérablement le nombre de cellules cibles potentielles pour l'IL-6 (39). Cette observation est importante concernant les réponses inflammatoires *in vivo* puisque les cellules endothéliales et musculaires lisses, qui exercent des rôles clés dans les processus inflammatoires, n'expriment pas l'IL-6R α à la membrane. Ainsi, grâce à ce mécanisme, l'IL-6 peut agir sur ces cellules et par conséquent, elle peut jouer un rôle dans l'inflammation. Ce rôle de l'IL-6 est renforcé par le fait que cette cytokine induit, en combinaison avec le TGF β , la différenciation des cellules TH17 chez la souris, cellules impliquées dans les désordres inflammatoires lors de maladies autoimmunes (40). Des études récentes suggèrent que ce mécanisme de transsignalisation serait majoritairement impliqué dans la signalisation de l'IL-6, associée à son activité proinflammatoire sous conditions pathologiques (41-46).

Le groupe de Kishimoto a recherché la protéine capable de s'associer avec l'IL-6R α en présence d'IL-6 et de transduire un signal intracellulaire. Cette approche a permis d'identifier la molécule gp130 (47). Contrairement à l'IL-6R α dont l'expression est restreinte, l'expression de gp130 est ubiquitaire. Cette glycoprotéine, dont le gène est localisé sur le chromosome 5 chez l'homme, a une masse moléculaire de 130 kDa (47). Sa partie extracellulaire comporte, en N-terminal, un domaine de type « Ig like » puis un domaine CBD, constitué d'un premier domaine FnIII présentant les quatre cystéines en positions conservées et d'un second contenant le motif WSDWS, et enfin de trois domaines FnIII dans

la région proximale à la membrane plasmique. La région intracellulaire de ce récepteur est impliquée dans la transduction du signal et contient des motifs fonctionnels conservés (une boîte 1, une boîte 2 et une boîte 3).

Chez la souris, l'inactivation du gène gp130 conduit à la mort des embryons entre le 12ème et le 17ème jour de gestation. Ce phénotype létal est associé à un défaut majeur dans le développement du myocarde et à des défaillances au niveau de l'hématopoïèse (48). Afin d'étudier le phénotype adulte correspondant à l'inactivation de gp130, un modèle d'inactivation inductible a été élaboré chez la souris montrant des déficits neurologiques, cardiaques, hématopoïétiques, hépatiques et pulmonaires. Ces observations soulignent ainsi l'importance de gp130 et donc des cytokines de cette famille dans le développement mais également chez l'adulte (49). La distribution ubiquitaire de gp130 s'explique donc par l'importance de cette chaîne et le fait qu'il représente l'élément incontournable des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 (47).

L'IL-6, via son site I, se fixe sur son récepteur de basse affinité l'IL-6R α et ce complexe recrute ensuite gp130 pour former le récepteur de haute affinité pour l'IL-6 (Kd=10⁻¹¹M). De plus, il a été montré que le complexe IL-6/IL-6R α /gp130 est actif sous forme hexamérique avec deux molécules d'IL-6, deux d'IL-6R α et deux de gp130 (22). L'IL-6 ou l'IL-6R α sont incapables de fixer gp130 individuellement (34, 47).

Les souris transgéniques doubles, qui surexpriment IL-6 et IL-6R α , présentent une activation constitutive de gp130 entraînant alors une hypertrophie cardiaque et une hyperplasie des cellules hépatiques (50, 51). Ces résultats suggèrent donc le rôle essentiel de ces protéines dans la physiologie du myocarde et du foie *in vivo*.

2.2. L'interleukine 6 virale

L'interleukine 6 virale (IL-6v) a été isolée à partir de tissus infectés par le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV8) (52). Cette protéine virale de 204 acides aminés présente 24,7% d'identité et 49,7% de similarité avec l'IL-6 humaine.

Ses activités semblent très proches de celles de son homologue humain, puisque l'IL-6v entraîne la prolifération de lignées cellulaires issues de myélomes humains. Cependant, il semble que son activité spécifique soit plus modérée que celle de l'IL-6 (53). La découverte de cytokines virales, capables d'interagir avec des récepteurs humains, met en évidence le détournement des fonctions cellulaires au profit du virus. L'IL-6v favorise ainsi la

prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules infectées. Par conséquent, après une infection par le KSHV, cette cytokine pourrait favoriser le développement de pathologies liées à l'IL-6 humaine telles que le sarcome de Kaposi, la maladie de Castelman ou le myélome multiple (53). Plus récemment, il a également été démontré que l'IL-6v bloque le recrutement de neutrophiles *in vivo* lors de la phase aigüe de l'inflammation (54). Ces résultats démontrent que l'IL-6v peut modifier, voire supprimer, les réponses immunitaires innées chez l'hôte et, par conséquent, elle pourrait en partie être à l'origine de l'apparition d'infections opportunistes chez des patients infectés par le virus de l'herpès HHV8.

Le récepteur de l'IL-6v est constitué d'un homodimère de gp130 (55). La structure cristallographique de l'IL-6v complexée à gp130 a été résolue par l'équipe du Dr. K.C. Garcia. Ce complexe est tétramérique avec deux molécules d'IL-6v et deux molécules de gp130 (20) (figure 9). Chaque cytokine se fixe aux deux molécules de récepteur, le site II de l'IL-6v se lie au CBD de gp130 et le site III au domaine « Ig like » de l'autre molécule de gp130. Le site I de l'IL-6v reste accessible à une interaction potentielle avec un récepteur de type α comme l'IL-6R α qui pourrait ainsi moduler l'activité de l'IL-6v.

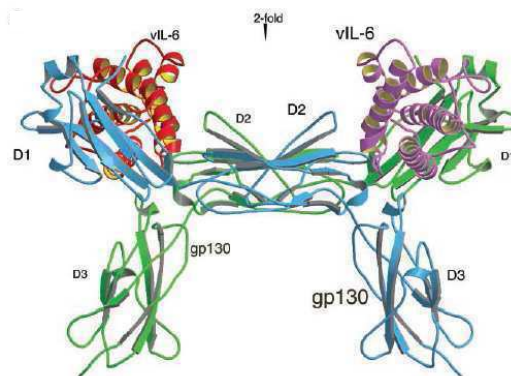


Figure 9 : Représentation en ruban du complexe IL-6v/gp130
(d'après Chow *et al.*, Science, 2001).

2.3. L'interleukine 11

D'abord identifiée chez le primate, l'IL-11 a été clonée à partir de la lignée cellulaire stromale de moëlle osseuse PU34 et son homologue humain, dont le gène se situe sur le chromosome 19, a été cloné à partir de la lignée de cellules primaires embryonnaires de poumon MRC-5 (56). L'IL-11 a d'abord été identifiée pour son action proliférative sur une

lignée cellulaire de plasmacytome murin et pour son rôle inhibiteur de l'adipogénèse sur la lignée cellulaire 3T3-L1 (57, 58). Cette protéine de 23 kDa est produite par de nombreux types cellulaires parmi lesquels, différentes lignées cellulaires fibroblastiques ainsi que des glioblastomes ou des mélanomes (59).

Comme les autres cytokines de la famille de l'IL-6, l'IL-11 exerce des activités pléiotropiques. Cette protéine a un rôle dans le système hématopoïétique. Elle stimule l'augmentation du nombre et de la taille des colonies de précurseurs mégacaryocytaires en synergie avec l'IL-3, le SCF ou la TPO, ce dernier étant le facteur de croissance majeur de ce type cellulaire (60, 61). Elle permet aussi d'augmenter la réponse anticorps spécifique de l'antigène (62) et elle intervient comme cofacteur dans l'érythropoïèse (63). En dehors du système hématopoïétique, l'IL-11 agit sur les adipocytes et augmente la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (64). Elle joue également un rôle dans le développement nerveux en induisant une différenciation neuronale et en favorisant la maturation et la survie des oligodendrocytes ainsi que la formation de myéline (65, 66) ou encore dans le remodelage osseux par induction de la formation d'ostéoclastes (67). Il a été décrit, comme pour le LIF, une expression de l'IL-11 au niveau utérin chez des souris gestantes et un rôle majeur a été observé pour l'implantation de l'embryon dans l'utérus (68). Plus récemment, cette cytokine a été qualifiée de « cardioprotectrice » (69) et elle est testée en clinique pour éviter la thrombopénie chez des patientes atteintes d'un cancer du sein et traitées par chimiothérapie ou chez des patients atteints de myélodysplasie (70, 71).

En 1994, le groupe de Hilton a cloné un récepteur murin de faible affinité pour l'IL-11 ($K_d=10$ nM) : il s'agit de l'IL-11R (72). Son homologue humain, identifié par le groupe de Yannick Jacques, possède 82% d'homologie avec la chaîne murine (73). Il est exprimé dans les tissus hématopoïétiques tels que la moelle osseuse, le thymus, la rate, mais également dans le cerveau, le cœur, le rein et l'utérus (72). L'IL-11 se fixe sur l'IL-11R et ce complexe recrute ensuite la chaîne gp130, pour former le récepteur de haute affinité de l'IL-11 ($K_d=300-800$ pM) (figure 10) (74). Dans sa région extracellulaire, l'IL-11R possède en N-terminal, un domaine de type « Ig like », puis un domaine CBD suivi de trois domaines FnIII. Le domaine intracellulaire de ce récepteur est très court et n'induit pas de signal intracellulaire (75).

L'inactivation du gène de l'IL-11R n'entraîne pas de défaillance dans l'hématopoïèse (76), les souris femelles sont stériles en raison d'un défaut d'implantation de l'embryon dans

l'utérus (68). Ce phénotype est à rapprocher de celui des souris inactivées pour le LIF et il révèle un rôle majeur de l'IL-11 dans la fertilité.

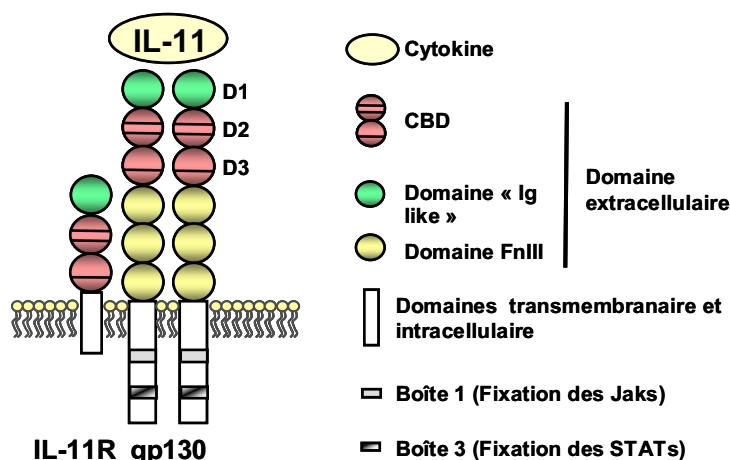


Figure 10 : Représentation schématique du récepteur de l'IL-11.

2.4. La cardiotrophine 1

La cardiotrophine 1 (CT-1) est une cytokine isolée pour sa fonction hypertrophiante, *in vitro*, sur des cellules du myocarde (77). Caractérisée dans un premier temps chez la souris, elle fut ensuite identifiée chez l'homme puis chez le rat. Chez l'homme, son gène se situe sur le chromosome 16 et sa masse moléculaire apparente est de 21,5 kDa (78). Cette protéine, bien que sécrétée, ne possède pas de peptide signal. Son transcrit est exprimé dans différents tissus chez l'adulte comme, par exemple, le cœur, le muscle squelettique, le foie, le poumon et le rein.

Ses activités biologiques sont multiples, la CT-1 permet d'inhiber la prolifération de la lignée myéloïde M1 et d'induire sa différenciation en macrophages. La CT-1 inhibe également la différenciation spontanée des cellules souches embryonnaires (79). Comme d'autres cytokines de la famille, la CT-1 est un inducteur des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes (80) et elle induit la sécrétion d'IL-6 par certains types cellulaires (81). Récemment, un rôle hépatoprotecteur de la CT-1 a été mis en évidence en démontrant que cette cytokine est un facteur de survie des hépatocytes (82, 83). Au niveau du système nerveux, la CT-1 est un facteur de croissance pour différents types de neurones (sensitifs, dopaminergiques, cholinergiques et moteurs) (77, 79) et elle permet d'induire la différenciation des neurones noradrénergiques en neurones cholinergiques, ainsi que la survie des neurones dopaminergiques de rat (84). Comme le LIF, la CT-1 induit, en synergie avec la

« Bone Morphogenetic Protein-2 » (BMP-2), la différenciation des cellules neuroépithéliales en astrocytes (85). De plus, il a été montré que la CT-1 est capable, *in vitro* et *in vivo*, de maintenir la survie de motoneurones embryonnaires (86). L'inactivation du gène de la CT-1 confirme ces résultats, puisqu'elle entraîne une augmentation de la mort de certaines sous-populations de motoneurones (87). De plus, les souris déficientes en CT-1 présentent une sensibilité accrue à l'apoptose hépatique et l'injection de CT-1 induit une hypertrophie hépatique confirmant ainsi le rôle hépatoprotecteur de cette cytokine (87-89).

Des études fonctionnelles et de fixation sur le récepteur ont montré que la CT-1 se fixe sur un hétérodimère constitué de gp130 et de LIFR (figure 11) (79, 86, 90, 91). Cependant, il a été rapporté que la signalisation induite par la CT-1 dans les cellules neuronales pourrait nécessiter une sous-unité, non identifiée à ce jour, associée au complexe gp130/LIFR (90, 91). Ces études ont également montré que la CT-1 se fixe au LIFR avec une affinité équivalente à celle du LIF mais elle ne peut pas fixer gp130 individuellement. Cependant l'addition de gp130 potentialise la fixation de CT-1 au LIFR. De ces observations, il a été déduit que la CT-1 se fixe au LIFR avec une faible affinité puis ce complexe recrute gp130 afin de former un récepteur de haute affinité (79).

2.5. Le « ciliary neurotrophic factor »

Le « ciliary neurotrophic factor » (CNTF) est une protéine de 22 kDa dont le gène humain est situé sur le chromosome 11. Tout comme la CT-1, cette protéine cytoplasmique ne possède pas de peptide signal (92) et elle serait libérée dans des situations traumatiques après des lésions tissulaires où elle aurait alors un rôle protecteur.

Cette cytokine possède des actions redondantes avec les autres cytokines de la famille sur les cellules hépatiques (93) et au niveau de l'hématopoïèse, mais également sur le maintien de la totipotence de cellules souches embryonnaires (94) et sur l'induction de la différenciation des neurones adrénergiques vers la voie cholinergique (95). Comme son nom l'indique, ses effets biologiques ont lieu principalement au niveau du système nerveux. En effet, le CNTF a d'abord été identifié pour sa capacité à maintenir en culture des neurones ciliaires de poulet (96). De plus, de nombreuses études ont montré qu'il est un facteur de survie pour des populations neuronales *in vitro*, tels que des motoneurones embryonnaires (97), et *in vivo* sur des motoneurones après axotomie (98). Le CNTF induit également la différenciation des précurseurs astrocytaires (99), favorise la maturation, la survie des

oligodendrocytes (100) et le maintien de l'intégrité musculaire au cours du vieillissement (101). Produite essentiellement par les astrocytes et les cellules de Schwann, cette neurotrophine est sans homologie avec les autres facteurs neurotrophiques identifiés préalablement.

L'inactivation du gène du CNTF entraîne un phénotype modéré et plus précisément une légère dégénérescence des motoneurons accompagnée d'une réduction mesurée de la force musculaire des souris (102). De plus, des mutations du gène du CNTF ont été identifiées chez des sujets japonais et ces mutations qu'elles soient homo- ou hétérozygotes n'entraînent pas de troubles neurologiques particuliers (103). Du fait de ses effets neuroprotecteurs (104, 105), des essais cliniques utilisant le CNTF ont été menés en particulier chez des patients présentant une sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou la maladie de Huntington. Ces études n'ont pas démontré l'efficacité du CNTF dans le traitement de ces maladies (106-108). Cependant une étude récente démontre que les effets du CNTF peuvent être augmentés par l'ajout de la chaîne CNTFR α sous forme soluble (109).

Le récepteur du CNTF, ou CNTFR α , a été cloné en 1991 par l'équipe de G. Yancopoulos (110). Le gène codant pour le CNTFR α est localisé sur le chromosome 9 et la protéine a une masse moléculaire apparente de 72 kDa. A l'origine, son expression était décrite seulement au niveau des tissus nerveux (110) mais depuis, elle a également été détectée dans les muscles squelettiques, les reins, la peau, les testicules ou le nerf sciatique (111). Le domaine extracellulaire de ce récepteur est constitué d'un domaine « Ig like » et d'un domaine CBD suivi de trois domaines FnIII. Cependant, ce récepteur ne comporte pas de domaine transmembranaire, il est ancré dans la membrane par un groupement « glycosyl-phosphatidyl-inositol » (GPI). Ce dernier est sensible à la protéolyse et au clivage par la phospholipase C et ainsi, une forme soluble agoniste du CNTFR α peut être générée (112, 113). Le CNTF se fixe via le site I sur le CNTFR α et recrute dans un second temps l'hétérodimère gp130/LIFR β , via ses sites II et III respectivement, afin d'initier la transduction du signal intracellulaire (114, 115) (Figure 11). La stoechiométrie du complexe multimérique du CNTF n'est pas totalement élucidée. Certains auteurs proposent un modèle hexamérique, sur le modèle de l'IL-6, constitué de deux molécules de CNTF, deux de CNTFR α et de l'hétérodimère gp130/LIFR β (116). Un modèle tétramérique a également été proposé constitué d'une molécule de CNTF, une de CNTFR α et de l'hétérodimère gp130/LIFR β (117).

L'inactivation du gène codant pour le CNTFR entraîne des déficiences sévères dans le développement embryonnaire des motoneurons et des muscles squelettiques à l'origine de la mort périnatale des animaux (118). Ce phénotype, qui contraste singulièrement avec celui des souris déficientes en CNTF (102), laissait penser qu'il existait d'autres ligands « CNTF like » impliqués dans le développement embryonnaire des motoneurons. Deux ligands « CNTF like » ont été identifiés au laboratoire : il s'agit de CLC (119, 120) et de la NP (121).

2.6. Le « cardiotrophin like cytokine »

Le « cardiotrophin like cytokine » (CLC), encore appelé « novel neurotrophin-1 » (NNT1) ou « B-cell stimulating factor-3 » (BSF-3) a été mis en évidence à partir de banques d'ESTs (122, 123). Cette protéine de 22 kDa est ubiquitaire et son gène, situé sur le chromosome 11, est disposé en tandem avec le gène du CNTF. En effet, son transcrite est exprimé dans la rate, les leucocytes du sang périphérique, la moelle osseuse, les ovaires, le cœur, le foie, le colon et le rein. Cette cytokine joue un rôle au niveau des organes lymphoïdes car un traitement des souris avec du CLC entraîne une hyperplasie des cellules B accompagnée d'une augmentation des taux sériques d'immunoglobulines G et M (122, 124). De plus, CLC est décrit comme étant un facteur de survie et de croissance de myélomes (125). De manière similaire au CNTF, CLC induit la différenciation des cellules neuroépithéliales en astrocytes (126), il favorise la survie des motoneurons et des neurones sympathiques de poulet, et il induit une perte de poids chez les souris (122). Une étude montre que CLC est exprimé dans les muscles squelettiques de souris lors du développement et une perte de motoneurons est observée chez des souris déficientes pour le récepteur du CNTF (127). Une autre étude a mis en évidence un rôle inattendu de CLC au niveau du cerveau. En effet, cette cytokine semble être impliquée dans la régulation du cycle circadien de l'activité locomotrice chez les mammifères (128). Et enfin, nous avons récemment mis en évidence que des patients atteints de la maladie appelée « Cold-Induced Sweating Syndrome » (CISS) présentaient des mutations conduisant à une inactivation de CLC (129). Nous avons ainsi démontré pour la première fois une corrélation entre l'inactivation d'une cytokine de type I et le développement d'une maladie. En effet, de nombreuses situations pathologiques ont été attribuées à des mutations au niveau des récepteurs de cytokines de type I mais aucune inactivation des ligands correspondants n'avait encore été observée. Cette observation est le reflet de l'importante redondance fonctionnelle des cytokines de cette famille. Ainsi, le phénotype de ces patients CISS est une évidence directe de fonctions non-redondantes d'une cytokine de

type I dans le développement humain et dont l'inactivation semble être impliqué dans le développement de la maladie.

CLC possède un peptide signal contrairement au CNTF et à la CT-1, cytokines avec lesquelles il a une forte homologie. Cependant, il doit s'associer à une chaîne réceptrice soluble afin d'être sécrété. Nous avons montré que deux récepteurs solubles interagissaient avec CLC : il s'agit d'un nouveau récepteur soluble le « cytokine like factor » (CLF) (17, 119, 130) et de la forme soluble du CNTFR α (CNTFRs) (120). CLC s'associe à CLF via son site III et au CNTFRs par l'intermédiaire de son site I (16). D'une part, le complexe CLC/CNTFRs recrute l'hétérodimère gp130/LIFR pour générer un signal intracellulaire (figure 11). D'autre part, le complexe CLC/CLF se fixe sur un récepteur tripartite constitué de gp130/LIFR/CNTFR (figure 11) (119), et induit ainsi les voies de signalisation intracellulaire. Le signal intracellulaire induit par ces deux complexes est identique (131).

Les souris déficientes en CLF sont incapables de téter et meurent rapidement après la naissance (130). Une analyse phénotypique plus détaillée a révélé que ces souris présentaient une déficience en motoneurones (132). Ce phénotype est similaire à celui des souris déficientes en CNTFR α , suggérant ainsi que la partie cytokinique du complexe CLC/CLF est elle aussi importante pour le développement nerveux. De plus, comme cela a été décrit pour CLC, des mutations au niveau du gène codant pour CLF ont été décrites comme étant corrélées à la maladie CISS (133).

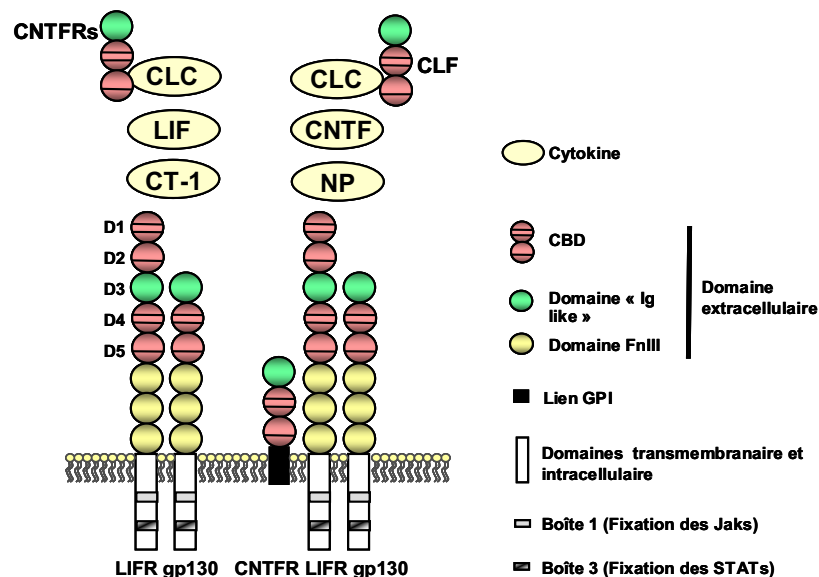


Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs de la CT-1, du CNTF, de CLC et de la NP.

2.7. La « neuropoïétine »

La « neuropoïétine » (NP) est une cytokine récemment identifiée dans notre Unité par un criblage informatique des banques de données génomiques murines, basé sur un profil structural des cytokines de la famille de l'IL-6 (annexe 1). Le gène de la NP murine est situé sur le chromosome 7. Des orthologues de la NP ont été identifiés chez le rat, le chimpanzé et l'homme. Chez ce dernier, le gène est situé sur le chromosome 16 et disposé en tandem avec le gène de la CT-1. Cependant une délétion de huit nucléotides dans l'exon 3 est observée et conduit à une modification du cadre de lecture, et par conséquent à une protéine non fonctionnelle. Le gène de la NP humaine est ainsi qualifié de « pseudogène » (121).

La NP est exprimée uniquement pendant la vie embryonnaire et en particulier au jour 11 de gestation. La NP n'est apparemment pas transcrite pendant la vie adulte de la souris. Elle est très fortement exprimée dans le neuroépithélium embryonnaire des vésicules cérébrales, de la rétine et de l'épithélium olfactif. La NP entraîne, tout comme le CNTF, la survie de motoneurons embryonnaires *in vitro* et la prolifération de précurseurs neuronaux, les neurosphères, en association avec de l'EGF et du FGF2 (121). De même que les autres cytokines de la famille, la NP induit également la différenciation des astrocytes en synergie avec la protéine BMP-2 (134).

Le récepteur de la NP est hétérotrimérique constitué de la chaîne CNTFR α et des deux chaînes de transduction du signal, gp130 et LIFR (figure 11) (121). Les voies de signalisation recrutées par la NP sont très proches de celles recrutées par le CNTF ou le CLC (Guilhot *et al.*, en préparation). De façon surprenante, le CNTFR et la NP sont détectés aux mêmes stades de développement embryonnaire, alors que le CNTF et le CLC ne sont pas encore exprimés. Cette observation laisse penser que la NP est le ligand du CNTFR qui interviendrait dans les stades précoces de développement embryonnaire alors que le CNTF et le CLC prendraient le relais pour des stades plus tardifs.

2.8. Le « leukemia inhibitory factor »

Le « leukemia inhibitory factor » (LIF) a été identifié pour ses effets inhibiteurs de la prolifération –comme son nom l'indique- et inducteur de la différenciation macrophagique de la lignée leucémique myéloïde M1 (135). A l'inverse, il peut induire la prolifération de la lignée murine leucémique DA et il a ainsi été identifié sous le nom d'HILDA (Human interleukin for DA cells) (136). Son gène est situé sur le chromosome 22. La taille de la

protéine est de 20 kDa mais elle peut être très largement augmentée par des N- ou O-glycosylations (136, 137). Cette protéine est produite par de multiples organes ou tissus comme le poumon, la peau ou le cœur, mais également par des lignées tumorales.

De nombreuses activités du LIF sont partagées avec les autres cytokines de la famille. En effet, le LIF entraîne la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes (138). Il agit également sur la balance ostéoblastes/ostéoclastes en favorisant la résorption osseuse par son action sur les ostéoclastes (139, 140) ou, au contraire, en augmentant le nombre d'ostéoblastes (141). Son action dépend alors des conditions de culture (142). Au niveau du système nerveux embryonnaire, le LIF permet une différenciation des neurones adrénergiques vers la voie cholinergique (143). Il est aussi capable de faire proliférer les cellules souches embryonnaires (ES) en culture en les maintenant à un stade indifférencié et totipotent (144, 145). Il permet également d'inhiber une lipase, entraînant alors une diminution de l'incorporation des acides gras circulants dans les tissus adipeux et une dégradation de ces tissus (146).

Les souris déficientes en LIF présentent un défaut de cellules souches hématopoïétiques confirmant ainsi l'implication du LIF dans l'hématopoïèse (147). En effet, cette cytokine est capable, en synergie avec d'autres facteurs hématopoïétiques, de potentialiser le développement de cellules progénitrices hématopoïétiques et d'induire la production de thrombocytes (148-151). L'inactivation du gène du LIF chez des souris met également en évidence le rôle primordial de cette molécule dans l'implantation du blastocyste au niveau de l'utérus, puisque ces souris sont stériles (152). D'autre part, il a été montré une déficience en LIF, au niveau de l'utérus de femmes prédisposées à des avortements à répétition, et plus particulièrement une diminution de la production de LIF par les cellules Th2 (153, 154). Ces résultats montrent que la disponibilité du LIF au niveau utérin est essentielle à la grossesse (155). Une étude récente démontre également qu'un antagoniste du LIF inhibe l'implantation du blastocyste chez la souris. Cet antagoniste pourrait être utilisé comme méthode de contraception non hormonale (156).

Le récepteur de basse affinité du LIF, appelé LIFR β , a été cloné en 1991 par l'équipe de Gearing en criblant une banque d'ADNc de placenta. Le gène de ce récepteur est localisé sur le chromosome 5. Avec une masse moléculaire apparente de 190 kDa, cette glycoprotéine est également appelée gp190. Sa distribution tissulaire est très étendue et son expression est plus particulièrement élevée dans le foie, le placenta, les monocytes et les cellules souches embryonnaires. Elle fixe le LIF avec une faible affinité ($K_d=10^{-9}M$) (157). Son domaine

extracellulaire est formé en N-terminal d'un domaine CBD, suivi d'un domaine de type « Ig like », puis d'un second domaine CBD et de trois domaines FnIII. Le domaine intracellulaire de ce récepteur contient des motifs fonctionnels conservés (une boîte 1, une boîte 2 et une boîte 3). Après la fixation du LIF, le LIFR s'hétérodimérise avec la chaîne gp130, pour former le récepteur de haute affinité du LIF ($K_d=10^{-11}M$) et induire la signalisation intracellulaire (figure 12) (158). La protéine murine a également été clonée et possède 70% d'identité avec son homologue humain.

L'inactivation du gène codant pour le LIFR entraîne un défaut du placenta à l'origine de la malnutrition du fœtus. Ces résultats expliquent la forte expression du LIFR retrouvée au niveau du placenta. Les souris présentent aussi une déficience osseuse, une diminution du nombre d'astrocytes dans le cerveau et la moelle épinière, ainsi qu'une forte diminution du nombre de motoneurones, entraînant la mort périnatale des animaux (159, 160). Ce phénotype marqué contraste avec celui observé lors de l'inactivation du LIF, ce qui suggérait l'implication du LIFR dans d'autres complexes cytokines/récepteurs. Depuis, l'implication du LIFR a été démontrée dans la formation de récepteurs pour 5 autres cytokines (CT-1, CNTF, CLC, NP et OSM). Par ailleurs, une mutation affectant le LIFR a été décrite chez des patients atteints du syndrome de Schwartz-Jampel de type II (SJS2). Il s'agit d'une maladie congénitale qui se transmet de manière autosomique récessive et qui touche les muscles (myotonie congénitale), les os et les articulations. De plus, cette mutation a été reliée à une autre affection, le syndrome Stuve-Wiedemann (SWS) (161). Les chercheurs ont ainsi conclu que SWS et SJS2 constituent une seule maladie, du point de vue clinique et génétique.

2.9. L'oncostatine M

L'oncostatine M (OSM) est une cytokine identifiée à partir de milieu conditionné de la lignée leucémique histiocytaire U937 après stimulation par un ester de phorbol (162, 163). Son gène, situé sur le chromosome 22, est proche de celui du LIF et des études génomiques de l'OSM, du LIF, du G-CSF et de l'IL-6 révèlent que ces protéines seraient issues d'un gène ancestral unique (164). La protéine mature a une masse moléculaire de 28 kDa et elle est produite principalement par les monocytes, les lymphocytes T et les cellules dendritiques activés. Cette protéine a d'abord été caractérisée pour son action cytotatique vis-à-vis de certaines lignées tumorales, en particulier grâce à son activité inhibitrice de la prolifération d'un mélanome humain A375 (163, 165, 166). A l'opposé, l'OSM peut stimuler la croissance des cellules de sarcome de Kaposi isolées chez des patients atteints du SIDA (167) ou induire

la survie des cellules de Sertoli (168). En plus de ses activités spécifiques, l'OSM agit également sur des systèmes biologiques communs aux autres cytokines de la famille, comme l'activation hépatocytaire inflammatoire, le maintien des cellules souches embryonnaires dans un état indifférencié, le développement nerveux ou le remodelage osseux (169, 170). Les activités biologiques de cette cytokine, ainsi que son implication dans des pathologies, sont présentées plus en détails dans le chapitre 3.

L'OSM peut exercer son activité biologique par l'intermédiaire d'un récepteur de haute affinité formé de l'hétérodimère gp130/LIFR. Ce récepteur est dit « de type I » (158). Dans ce cas, l'OSM recrute dans un premier temps la chaîne gp130 puis le LIFR (figure 13) (158, 171). Cependant, cette cytokine peut interagir avec un autre récepteur dit « de type II ». Ce dernier est un hétérodimère constitué de la chaîne gp130 et d'une autre chaîne de transduction, d'une masse moléculaire apparente de 180 kDa, appelée OSMR (figure 12) (172, 173). Le gène codant pour l'OSMR est localisé sur le chromosome 5 et sa distribution tissulaire est étendue. En effet, il est exprimé dans les cellules endothéliales, hépatiques, pulmonaires et dans les cellules de la peau. Le domaine extracellulaire de cette glycoprotéine présente, en N-terminal, un domaine CBD tronqué, suivi d'un domaine de type « Ig like », puis d'un domaine CBD complet et de trois domaines FnIII. Le domaine intracellulaire contient des motifs fonctionnels conservés (une boîte 1, une boîte 2 et une boîte 3).

Les souris inactivées pour le gène de l'OSMR sont fertiles et viables. Le nombre d'érythrocytes et de plaquettes circulantes chez ces souris est diminué tout comme le nombre de progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires dans la moelle osseuse. Ces résultats soulignent le rôle de l'OSMR au niveau de l'hématopoïèse (174).

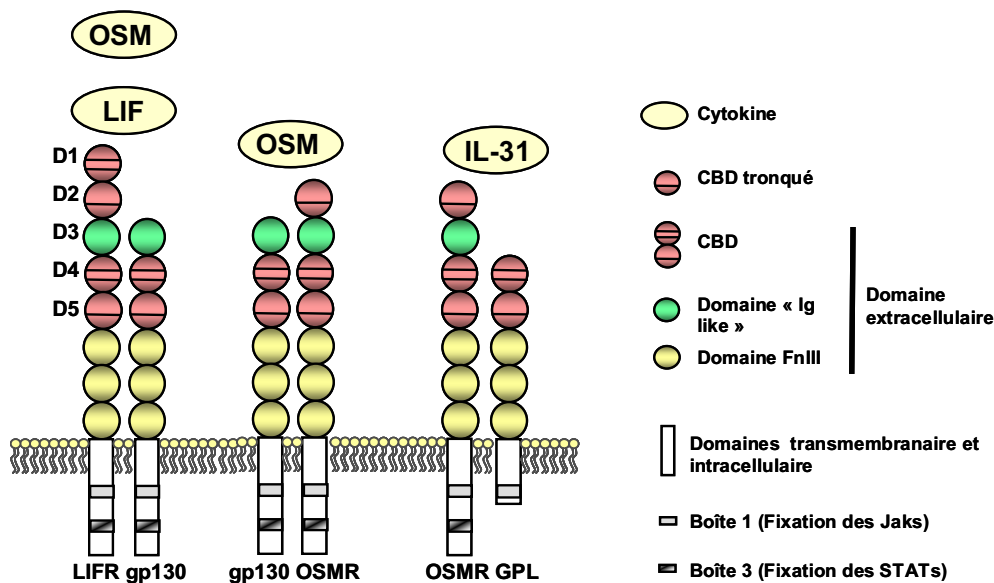


Figure 12 : Représentation schématique des récepteurs du LIF, de l'OSM et de l'IL-31.

2.10. L'interleukine-31

L'IL-31 est une cytokine récemment identifiée par Dillon et ses collaborateurs. Elle est apparentée aux cytokines de la famille de l'IL-6 de par sa structure et son récepteur (175). Cette protéine mature de 141 acides aminés présente une structure en quatre hélices alpha, caractéristique des cytokines de la famille de l'IL-6. Son gène, localisé sur le chromosome 12, est constitué de trois exons. Son homologue murin, situé sur le chromosome 5, a 31% d'homologie avec la protéine humaine. Cette dernière a une masse moléculaire de 24 kDa. L'injection d'IL-31 en sous-cutané, ou sa surexpression de manière transgénique chez des souris, entraîne une hyperkératinose, une alopecie et un prurit. Des symptômes similaires sont observés chez des patients atteints d'une pathologie cutanée inflammatoire appelée « dermatite atopique ». Ces résultats sont détaillés dans le chapitre 3.

Parallèlement à un autre groupe, nous avons identifié, par analyse bioinformatique, un récepteur orphelin (176, 177). La comparaison de la structure primaire de ce nouveau récepteur avec gp130 montre une identité de séquence de 28,5 % et nous l'avons ainsi appelé GPL pour « gp130-like protein ». GPL possède, dans sa partie extracellulaire, un peptide signal de 32 résidus, un domaine CBD contenant 4 cystéines en positions conservées et un motif WSDWS, puis trois domaines de type FnIII. Le domaine transmembranaire est suivi d'un domaine intracellulaire contenant une boîte 1, une région riche en prolines et trois tyrosines potentiellement importantes pour la fixation des molécules de signalisation. Nous avons cloné GPL à partir de l'ARNm d'une lignée myélomonocytaire U937. Cette protéine a une masse moléculaire de 110 kDa et sa structure tridimensionnelle est très proche de celle des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6. Des travaux de modélisation indiquent que l'organisation dans l'espace du CBD de GPL est également compatible avec les coordonnées tridimensionnelles des récepteurs voisins. GPL est exprimé dans des lignées cellulaires d'origine myélomonocytaires, dans des mélanomes, des glioblastomes, dans les tissus liés à la reproduction (ovaires, placenta, prostate et testicules), dans les poumons et dans la rate. De plus, ce nouveau récepteur est exprimé dans différentes populations de cellules du sang et de la moelle osseuse, comme les cellules souches CD133+, les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ et les populations myélomonocytaires. Nous avons également montré son expression dans les cellules dendritiques. L'expression des ARNm de GPL est modulable, notamment dans les monocytes par le CD40 ligand (CD40-L) et l'IL-1 α , plus faiblement par l'IFN γ et dans les cellules dendritiques par l'IFN γ . Au cours du clonage, nous avons identifié trois isoformes de cette protéine issues d'épissage alternatif de l'ARN de GPL.

A ce stade de notre travail, nous recherchions, d'une part, la ou les autre(s) chaîne(s) impliquée(s) dans le récepteur fonctionnel ainsi que le ligand. Dillon et ses collaborateurs ont alors identifié l'IL-31 comme ligand de GPL en combinaison avec la chaîne réceptrice OSMR (Figure 12).

Plusieurs études récentes démontrent que les souris déficientes en GPL ne présentent pas de phénotype majeur. Une première étude démontre seulement une implication du complexe IL-31/IL-31R dans la prolifération et la survie des progéniteurs myéloïdes (178). Une seconde étude démontre que les souris déficientes en GPL présentent des réponses Th2 exacerbées (179) et suggère ainsi un rôle de GPL dans la régulation négative de la réponse Th2. Cependant, ces observations confirment que le complexe IL-31/GPL pourrait représenter une cible thérapeutique dans le traitement de maladies inflammatoires caractérisées par une surexpression de cytokines Th2. Des études complémentaires sont évidemment nécessaires afin d'approfondir les connaissances sur ce nouveau complexe cytokine/récepteur.

2.11. L'interleukine 27

L'interleukine 27 (IL-27) est une cytokine composite formée d'une partie cytokinique, appelée p28, et d'un récepteur soluble de cytokine appelé « Epstein Barr virus induced gene 3 » (EBI-3) (180). Leurs gènes sont localisés respectivement sur les chromosomes 16 et 19. p28, comme son nom l'indique, est une protéine de 28 kDa qui a été identifiée récemment par criblage informatique sur des bases d'ESTs humains et murins. Sa structure, en quatre hélices α longues antiparallèles deux à deux, est apparentée à celle des cytokines des familles de l'IL-6 et de l'IL-12. Cependant, cette cytokine se distingue par une région située au niveau de la boucle CD et constituée de treize acides glutamiques. Ce type d'insertion de résidus chargés n'avait encore jamais été observé pour les autres cytokines et cette région pourrait interagir pour stabiliser la cytokine ou le complexe cytokine/récepteur. p28 doit être associée à EBI3 afin d'être sécrétée et active mais, contrairement à l'IL-12, ces deux sous-unités ne sont pas reliées par un pont disulfure.

L'IL-27 est produite par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sous conditions pro-inflammatoires. Elle induit alors l'expansion clonale de cellules T naïves exclusivement, puisqu'elle ne permet pas la prolifération et l'établissement de cellules T mémoires. L'IL-27, en synergie avec l'IL-12, induit la production d'IFN γ par les cellules T naïves et les « natural killer » (NK). De plus, elle induit la prolifération des cellules CD4⁺ naïves ainsi que leur différenciation en lymphocytes de type Th1 : elle favorise ainsi la mise en place d'une

réponse Th1 (181, 182). L'IL-27 est également un puissant suppresseur d'activités autoimmunes dans des modèles de pathologies associées à l'IL-17, produite par les cellules Th17 (183, 184). En effet, l'IL-27 est un puissant inhibiteur de la production d'IL-17 *in vitro* (185-187). De plus l'IL-27, et plus précisément son récepteur, sont impliqués dans la régulation négative de la réponse des cellules T (188). De par son activité, cette cytokine a donc été initialement classée dans la famille de l'IL-12. Cependant, d'après son récepteur, formé de gp130 et de l'IL-27R, elle est apparentée aux cytokines de la famille de l'IL-6. L'IL-27 fait ainsi le lien entre les cytokines de la famille de l'IL-6 et les cytokines de la famille de l'IL-12.

Le récepteur de l'IL-27 est formé des chaînes gp130 et IL-27R (figure 13), encore appelé TCCR (« T Cell Cytokine Receptor ») ou WSX-1 (« WSXWS type I cytokine receptor ») (181, 189, 190).

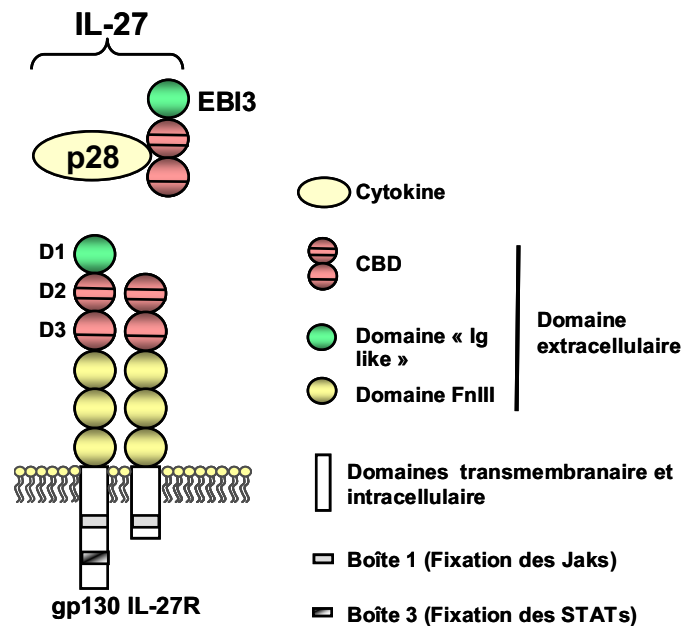


Figure 13 : Représentation schématique du récepteur de l'IL-27.

Le gène codant pour l'IL-27R est localisé sur le chromosome 19. L'IL-27R a été découvert à la suite du criblage, des banques de données génomiques, par homologie avec la séquence de gp130. Ce récepteur est proche de la sous-unité IL-12R β 2 du récepteur de l'IL-12 et il contient un motif WSXWS dégénéré (WGEWS). Sa distribution tissulaire est étendue et une très forte expression est retrouvée au niveau des lymphocytes du sang périphérique, des ganglions lymphatiques, du thymus et de la rate (189, 190).

Les souris inactivées pour le gène de l'IL-27R sont viables et fertiles mais leur réponse de type Th1 est affectée avec une diminution de la production d'IFN γ , en réponse précoce à des pathogènes, corrélée avec une augmentation de la production des cytokines Th2. Par conséquent, ces souris ont une sensibilité accrue à certains pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (189). A l'inverse, lorsque ces souris sont infectées par *Toxoplasma gondii*, elles sont capables d'éliminer ce pathogène mais développent une maladie inflammatoire létale (188). Cette pathologie est attribuée à une surproduction d'IFN γ associée à une absence de rétrocontrôle des cellules T activées : l'IL-27R aurait donc un rôle dans le rétrocontrôle de la réponse des cellules T. En effet, différentes études ont montré que l'IL-27 contribue au rétrocontrôle de la réponse immunitaire notamment celle liée aux cellules TH17 (191). En ce qui concerne l'inactivation de l'IL-27, des souris déficientes en EB13 ont été générées et elles présentent un phénotype similaire aux souris déficientes en IL-27R (192).

3. Les cytokines composites

Certaines cytokines de la famille de l'IL-6 sont des cytokines composites constituées d'une partie cytokinique et d'un récepteur soluble, situation similaire aux cytokines de la famille de l'IL-12. Il s'agit de CLC (CLC/CLF ; CLC/CNTFRs) (119, 120), de l'IL-27 (p28/EB13) (180) et des cytokines de la famille de l'IL-12, à savoir l'IL-12 (p35/p40) (193) l'IL-23 (p19/p40) (194) et l'IL-35 (p35/EB13) (195-197) (Figure 14).

A l'exception de CLC, la partie cytokinique de ces protéines composites possède un peptide signal mais elle doit être associée à un récepteur soluble pour être active et sécrétée. Outre l'IL-12, dont les sous-unités sont reliées par un pont disulfure, les autres cytokines sont associées de façon non covalente. D'une part, les parties cytokiniques peuvent se lier à deux récepteurs solubles différents : c'est le cas de CLC qui s'associe au CNTFRs ou au CLF, ou de p35 qui s'associe à p40 mais aussi à EB13. D'autre part, un même récepteur soluble peut aussi s'associer à deux cytokines différentes et assurer leur sécrétion. En effet, p40 s'associe à p35 mais aussi à p19 identifié sur la base de ses homologies avec p35, IL-6 et G-CSF. De façon analogue, EB13 permet la sécrétion des cytokines p35 et p28. Un même ligand peut donc être sécrété en s'associant à différents récepteurs solubles et, à l'inverse, un même récepteur soluble peut permettre la sécrétion de différentes cytokines (Figure 14).

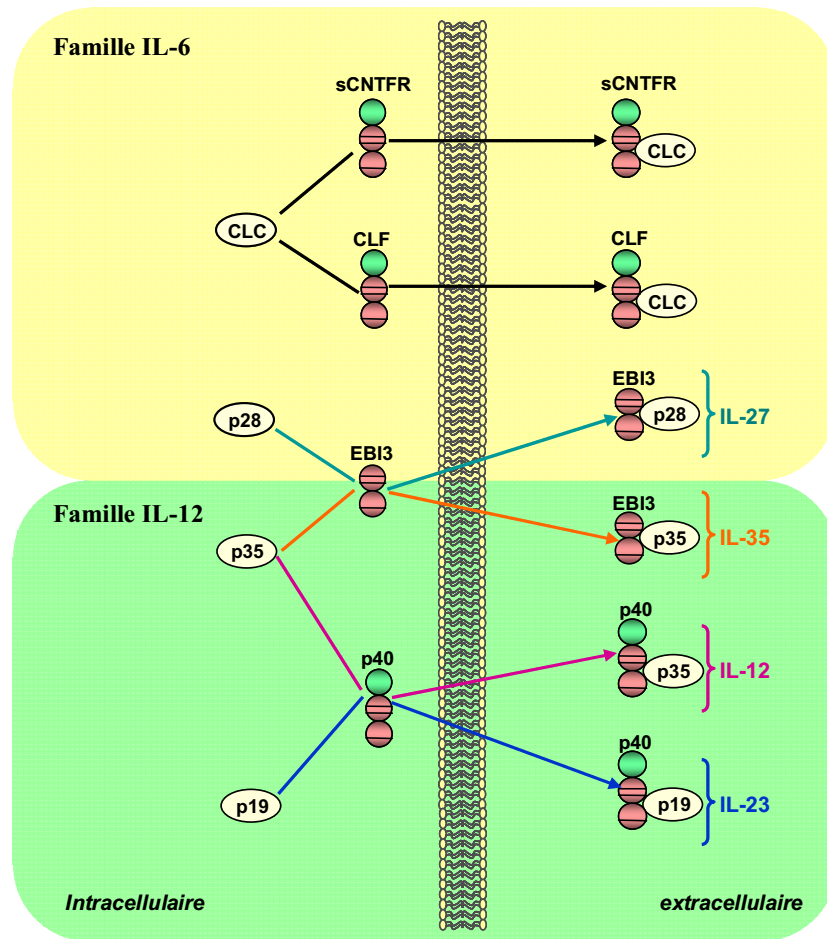


Figure 14 : Les cytokines composites de la famille de l'IL-6 et de l'IL-12

Ces nouvelles cytokines composites ont des activités qui leur sont propres. Les cytokines de la famille de l'IL-12 ont des activités au niveau du système immunitaire. L'IL-12 induit une différenciation Th1 et la sécrétion d'IFN γ par les cellules Th1 et les NK. L'IL-12 est ainsi définie comme un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (182, 198). L'IL-23 induit la prolifération des cellules T mémoires et la production d'IFN γ par ces mêmes cellules (199). Elle induit également l'expansion clonale des cellules Th17. Quant à l'IL-35, cette cytokine a été identifiée en 1997 mais aucune fonction biologique n'avait été mise en évidence jusqu'à récemment (195). Dans deux études, l'IL-35 est décrite comme une cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive grâce à l'expansion de cellules T régulatrices et la suppression des cellules Th17 (196, 197). De plus, son potentiel thérapeutique est démontré *in vivo* dans un modèle d'arthrite. Et enfin l'IL-27, comme nous l'avons vu, induit la prolifération des cellules CD4⁺ naïves et l'établissement d'une réponse Th1 (181) mais elle joue également un rôle dans le rétrocontrôle de la réaction immunitaire en fin de réponse (188, 200, 201).

Ce nouveau mécanisme de sécrétion génère une grande diversité fonctionnelle des cytokines et laisse présager de la complexité du réseau de régulation de ces nouvelles cytokines tant au niveau de leur sécrétion que de leurs activités biologiques.

4. Récapitulatif

Les cytokines de la famille de l'IL-6 ont donc des rôles biologiques extrêmement variés mais aussi redondants. Toutes ces protéines jouent un rôle au niveau des cellules nerveuses ou hématopoïétiques et entraînent aussi une activation hépatique en stimulant la synthèse des protéines de l'inflammation par les hépatocytes. Une grande partie des activités biologiques de ces cytokines sont résumées dans le tableau 1 et leurs propriétés biochimiques sont détaillées dans le tableau 2.

Activités biologiques	IL-6	IL-11	LIF	CT-1	CNTF	CLC	NP	OSM	IL-27	IL-31
Activités hématopoïétiques	+	+	+	+	+			+		+
Développement nerveux	+	+	+	+	+	+	+	+		
Activation hépatique	+	+	+	+	+	+	+	+		
Maintien des cellules souches embryonnaires	-	-	+	+	+	+	+	+		
Tissu osseux	+	+	+	+	+			+		
Fonction immunorégulatrice	+	+	-	-	-	+		-	+	+
Système cardiovasculaire	+	+	+	+				+		

Tableau 1 : Activités biologiques des cytokines de la famille de l'IL-6.

Propriétés biochimiques	IL-6	IL-11	LIF	CT-1	CNTF	CLC	NP	OSM	IL-27	IL-31
Nombre d'acides aminés précurseur	212	199	202	201	200	225	204	252	243	164
Nombre d'acides aminés protéine mature	184	178	180	201	200	198	182	196	215	141
Masse moléculaire (kDa)	21-28	23	45	21.5	21-28	22	22	28	24	24
N-glycosylation	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Nombre de ponts disulfures	2	0	3		0		0	2	0	1
Taille de l'ARNm (kb)	1.3	1.5-2.5	1.8-4	1.7	1	2.2	1.6	2	1.6	1.2-9.5
Nombre d'exons	5	5	3	3	3	3	3	3	5	3

Tableau 2 : Propriétés biochimiques des cytokines de la famille de l'IL-6.

Cette redondance fonctionnelle s'explique par la composition des récepteurs exprimés à la surface des cellules cibles, puisque ces récepteurs multimériques comprennent tous –à l'exception du récepteur de l'IL-31- la sous-unité transductrice gp130, qui entraîne une signalisation intracellulaire en réponse à différents ligands (Figure 15).

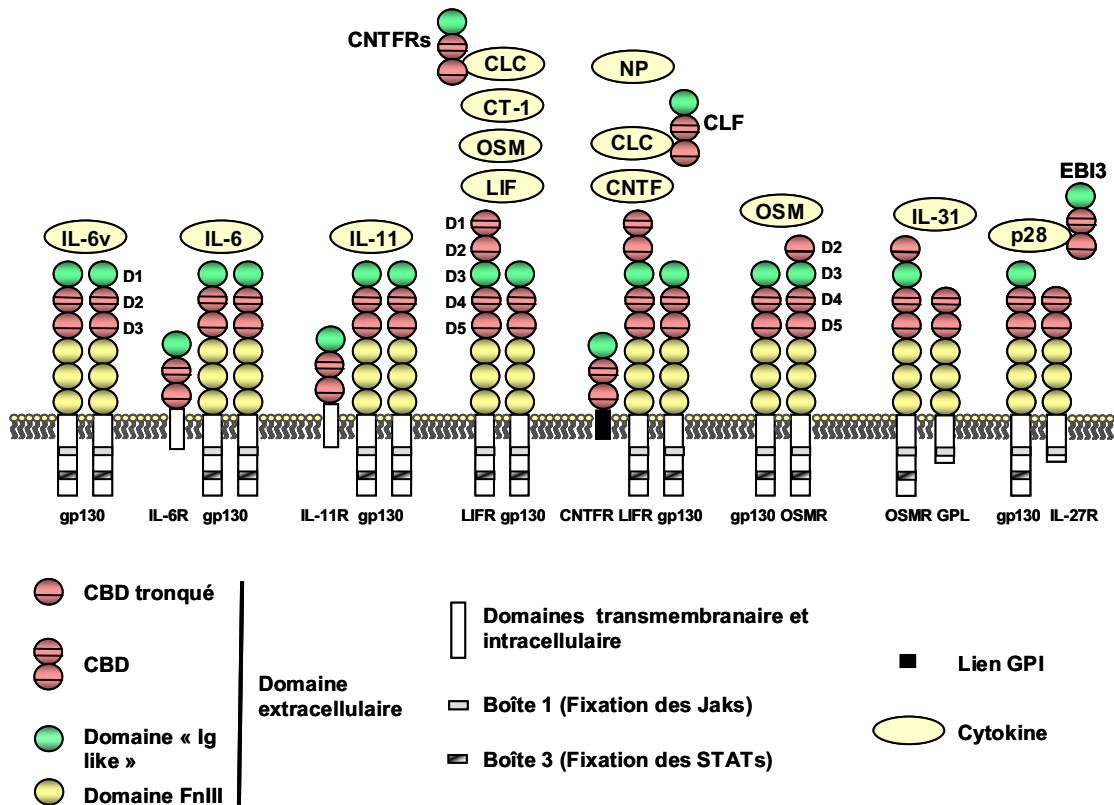


Figure 15 : Les cytokines de la famille de l'IL-6 et leurs récepteurs.

Chapitre 2

Les cytokines de la famille de l'interleukine 6 et la signalisation intracellulaire

La formation des complexes ligands/récepteurs est la première étape nécessaire à l'activation du signal intracellulaire. En ce qui concerne les cytokines de la famille de l'IL-6, leurs récepteurs sont tous multimériques et deux modèles de fixation du ligand sur les chaînes réceptrices peuvent être définis. D'une part, le ligand se fixe directement sur les chaînes de transduction (chaînes β) : c'est le cas de l'IL-6v, du LIF, de l'OSM, de la CT-1, de l'IL-27 et de l'IL-31. D'autre part, le ligand, complexé à une chaîne α , interagit ensuite avec les chaînes de transduction : il s'agit de l'IL-6, de l'IL-11, du CNTF, du CLC et de la NP.

Les chaînes β des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 ne possèdent pas d'activité catalytique intrinsèque. Cependant, suite à la fixation de la cytokine, les chaînes transductrices se dimérisent et elles sont alors phosphorylées. Ces observations ont conduit à la découverte de tyrosine kinases cytoplasmiques activées suite à la dimérisation des chaînes réceptrices. Ces protéines appartiennent à la famille des « Janus kinase » (Jaks) (figure 17). Elles induisent la phosphorylation de résidus tyrosines situés sur le domaine intracellulaire des chaînes β . Ces tyrosines phosphorylées deviennent des sites d'ancrage pour les domaines SH2 des facteurs de transcription de la famille des « signal transducer and activator of transcription » (STATs). Ces facteurs de transcription sont alors phosphorylés, se dimérisent puis migrent dans le noyau, où ils régulent la transcription de gènes cibles. D'autres voies de signalisation, telles que la voie des « mitogen activated protein kinase » (MAPK) et la voie PI3K/Akt, sont également impliquées dans la réponse intracellulaire induite par les cytokines de la famille de l'IL-6. Ces deux voies sont activées par l'intermédiaire de la protéine SHP-2, une tyrosine phosphatase, qui se fixe aux chaînes réceptrices phosphorylées. La voie des MAPK peut également être induite par une autre protéine adaptatrice appelée Shc. A l'inverse, il existe des protéines inactivant le signal. Elles permettent ainsi la mise en place de voies de régulation négative afin de ramener la cellule à son état basal.

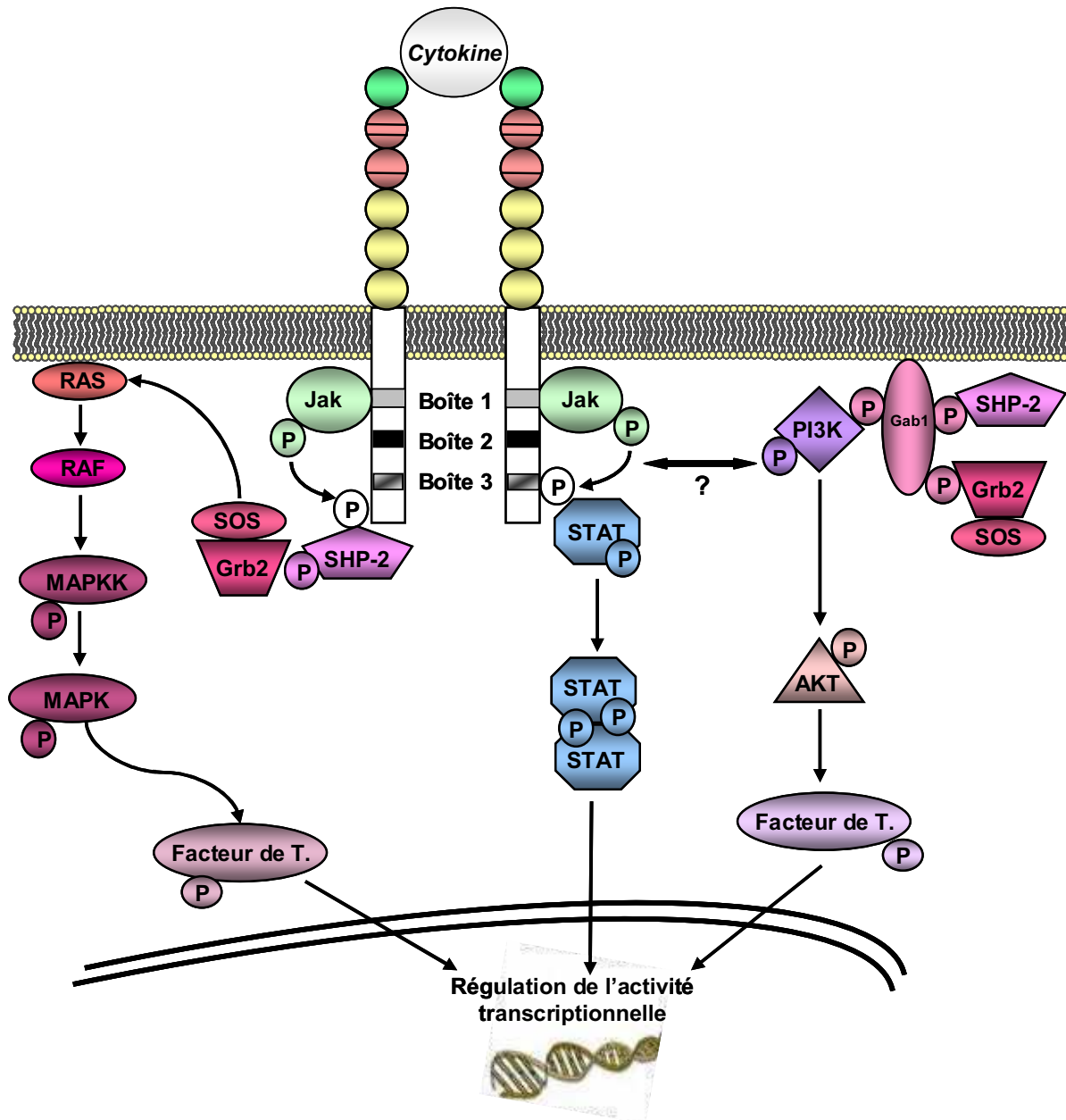


Figure 16 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation activées par les cytokines de la famille de l'IL-6.

1. Les protéines de la famille des « Janus kinases »

Les « Janus kinases » (Jaks) sont des protéines cytoplasmiques à activité tyrosine kinase dont la masse moléculaire varie entre 120 et 140 kDa. Elles sont actuellement au nombre de quatre : Jak1, Jak2 et Tyk2 sont exprimées de façon ubiquitaire alors que Jak3 est principalement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique (202) (Tableau 3). Les cytokines de la famille de l'IL-6 activent préférentiellement Jak1, mais également Jak2 et Tyk2.

	Taille (kDa)	Identité (%)	Localisation chromosomique	Expression
Tyk2	140	36	19p13.2	Ubiquitaire
Jak1	135	36	1p31.3	Ubiquitaire
Jak2	130	47	10p23-p24	Ubiquitaire
Jak3	120	-	4q31	Myéloïde/Lymphoïde

Tableau 3 : Caractéristiques des protéines de la famille des Jaks.

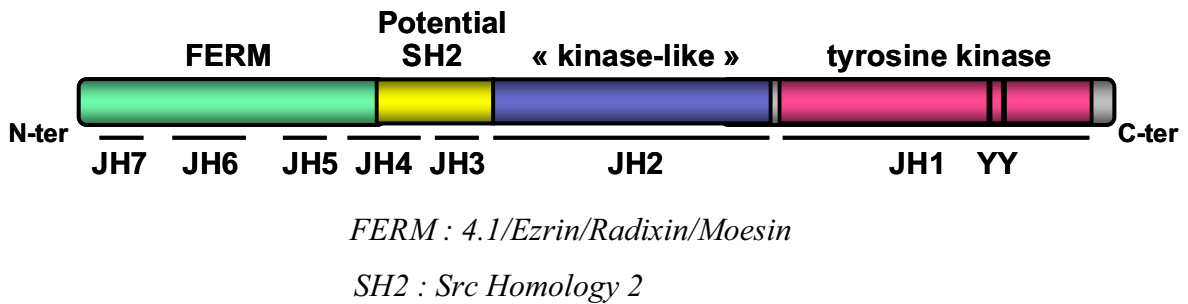


Figure 17 : Organisation structurale des protéines de la famille des Jaks.

Ces protéines sont constituées de différents domaines et en particulier d'un domaine tyrosine kinase ou « Jak homology » (JH) 1 en C-terminal (Figure 17). Le domaine JH1 contient deux résidus tyrosines nécessaires à l'activité tyrosine kinase des Jaks. En effet, la substitution de ces deux tyrosines (Y^{1054} et Y^{1055}) en phénylalanines dans la molécule Tyk2 entraîne une inactivation de la protéine. La mutation ponctuelle d'une des deux tyrosines (Y^{1007}) dans la molécule Jak2 conduit à la perte presque totale de l'activité tyrosine kinase de la protéine. Le domaine JH1 est précédé d'une région JH2 ou « kinase like domain », dont le rôle n'est pas clairement établi. Cependant, il semble que ce domaine régule négativement la fonction des protéines Jaks. La région N-terminale contient cinq autres régions, les domaines JH3 à JH7, conservées entre les différents membres de la famille des Jaks et impliquées dans l'association avec les chaînes réceptrices (203). Les Jaks se fixent sur deux motifs conservés du récepteur. Il s'agit de la boîte 1, une région riche en prolines et essentielle pour l'association des Jaks, et de la boîte 2 caractérisée par une suite d'acides aminés hydrophobes suivis d'acides aminés chargés positivement (202, 204-206). En plus de leur rôle dans la signalisation cellulaire, ces protéines sont impliquées dans le niveau d'expression de certains récepteurs à la surface des cellules. En effet, il a été montré que Tyk2 est nécessaire pour l'expression membranaire de IFNARI et, par conséquent, pour la fixation de l'IFN α (207,

208). De même, il a été mis en évidence que l'expression de l'OSMR à la membrane est diminuée dans des cellules déficientes pour Jak1 (209), ou que la protéine Jak2 est cruciale pour l'expression de l'EpoR à la surface (210).

La dimérisation du récepteur, induite par la fixation du ligand, permet la cross-phosphorylation, de résidus tyrosine des Jaks. Cette étape est nécessaire pour induire l'activation des Jaks préassociées aux chaînes réceptrices (211, 212). Les Jaks vont ensuite phosphoryler des résidus tyrosines situés dans la partie distale des sous-unités réceptrices. Ces tyrosines phosphorylées deviennent alors des sites d'ancrage pour les facteurs de transcription de la famille STAT (figure 17).

2. Les protéines de la famille des « signal transducer and activator of transcription » (STATs)

Les STATs sont des protéines intracellulaires d'une masse moléculaire apparente d'environ 85 kDa. Elles sont actuellement au nombre de sept : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6. Si l'expression de STAT4 est plus restreinte aux cellules d'origine myéloïde et testiculaire, les autres membres de la famille sont exprimés de façon ubiquitaire (213). En général, les différentes familles de récepteurs des cytokines activent certains membres de la famille des STATs de façon spécifique. Ainsi, concernant les cytokines de la famille de l'IL-6, elles induisent l'activation de STAT1, de STAT5 et surtout de STAT3 (203).

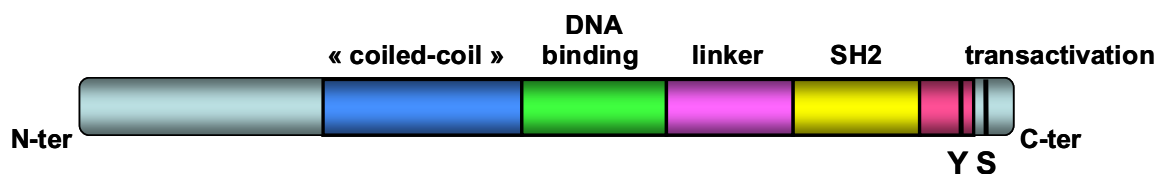


Figure 18 : Organisation structurale des protéines de la famille des STATs.

Les différents membres de cette famille présentent des motifs conservés. Dans leur partie N-terminale, ils sont constitués d'un domaine d'oligomérisation suivi d'un domaine « leucine zipper like » aussi appelé «coiled-coil domain » , d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine de liaison ou « linker» (figure 18). Leur extrémité C-terminale est formée d'un domaine SH2 et d'un domaine de transactivation. Ce domaine contient un résidu tyrosine, conservé dans toutes les STATs, qui est phosphorylé après activation des protéines.

Quant au domaine SH2, ses fonctions sont bien définies. D'une part, ce domaine est impliqué dans la fixation des STATs sur les résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs (211, 214). D'autre part, il intervient dans l'homo- ou l'hétérodimérisation des STATs entre elles lorsqu'elles sont phosphorylées sur leurs résidus tyrosine (211, 215-217). Récemment, il a été démontré que le domaine « coiled-coil » est essentiel à la fixation du domaine SH2 des STATs aux chaînes réceptrices et par conséquent, à leur activation (218).

Lors de l'activation, les récepteurs sont phosphorylés par les Jaks sur des résidus tyrosine conservés au niveau de la boîte 3 et localisés dans la partie la plus distale du récepteur. Ainsi, les STATs se fixent sur ces résidus phosphorylés par leur domaine SH2. Elles sont alors phosphorylées à leur tour, par les Jaks, sur leur résidu tyrosine en C-terminal. Cette phosphorylation entraîne un changement de conformation qui permet de libérer les STATs du récepteur. Ces protéines vont ensuite s'homo- ou s'hétérodimériser par fixation du domaine SH2 d'une STAT sur la tyrosine phosphorylée de l'autre STAT, et réciproquement (figure 19).

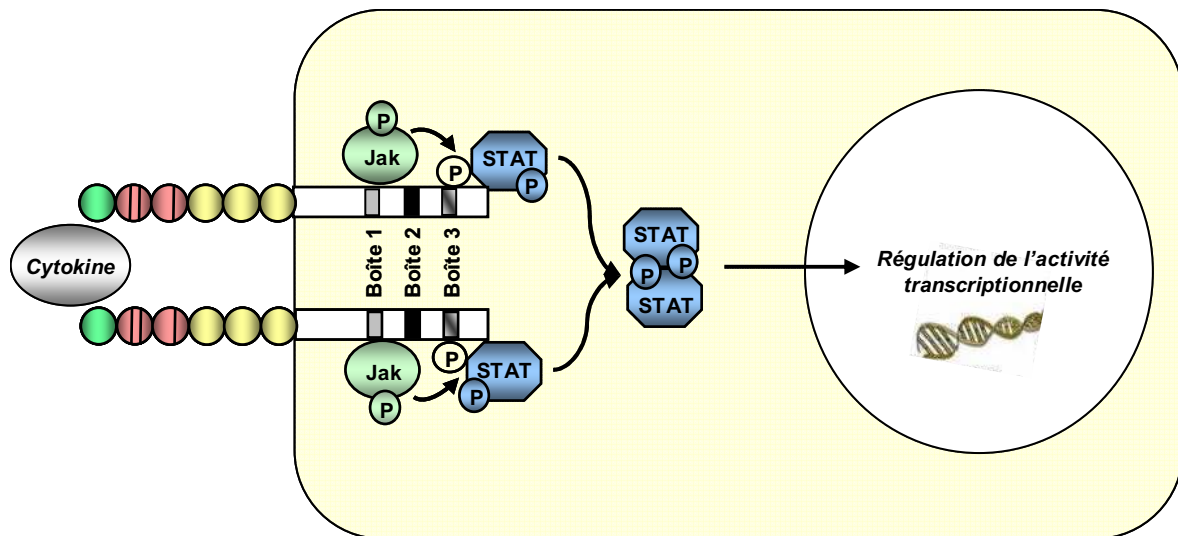


Figure 19 : Activation de la voie Jak/STAT par les cytokines de la famille de l'IL-6.

Cette dimérisation induit leur migration dans le noyau mais les mécanismes à l'origine de cette translocation ne sont pas encore totalement définis (219). Des études avaient pour but d'identifier des séquences de localisation nucléaire (NLS) ou des séquences d'export nucléaire (NES) sur la protéine STAT1. Des études de mutagenèse sur STAT5 ont démontré, pour la première fois, un rôle fonctionnel du domaine de liaison à l'ADN dans la translocation nucléaire. Initialement, une NES a été décrite dans STAT1 mais cette séquence s'est avérée être une séquence importante pour l'interaction de STAT1 avec une protéine de translocation

nucléaire ($\alpha 5$ -importine) et par conséquent, pour la translocation nucléaire de STAT1. Deux résidus adjacents (Lys⁴¹⁰ et Arg⁴¹³) ont été identifiés et contribuent aussi à la translocation nucléaire des dimères de STAT1. De plus, deux autres NESs ont été définies dans le domaine « coiled-coil » de STAT1, chacune contenant plusieurs résidus leucine qui sont essentiels à la fonction des NESs. Le chevauchement fonctionnel du domaine de fixation à l'ADN, des séquences NLS et NES semblent indiquer l'implication de la fixation à l'ADN dans la régulation du trafic nucléoplasmique des protéines STATs (203).

Dans le noyau, les STATs se fixent sur des séquences consensus de type GAS (TTN5AA) par l'intermédiaire de leur domaine de liaison à l'ADN, et régulent alors la transcription de gènes cibles situés en aval (219, 220). La nature des gènes cibles dépend probablement de la composition du dimère. Les STATs régulent la transcription de gènes très variés comme, par exemple, des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, certains facteurs de transcription (jun-B, C-fos, IRF-1, C/EBP δ), des protéines telles que le « vasoactive intestinal peptide » (VIP), les « heat shock protein » (hsp) et la protéine gp130 (215, 221).

Après fixation sur le récepteur, les STATs sont phosphorylées sur leurs résidus tyrosine mais elles peuvent également être phosphorylées plus tardivement sur des résidus sérine. La protéine kinase responsable de cette phosphorylation n'appartient pas à la famille des Jaks et sa nature dépend du contexte cellulaire ainsi que de la voie de signalisation activée. Il a été montré que cette phosphorylation tardive sur sérine permet de réguler, au moins partiellement, l'activité du domaine de transactivation des STATs. En effet, elle permet de stabiliser le complexe STAT3-STAT3/ADN (219). De plus, il semble qu'une activation optimale de la transcription nécessite la phosphorylation de STAT1 et STAT3 sur les résidus tyrosine mais également sur les résidus sérine (222).

Si la voie Jak/STAT est la voie de signalisation majoritaire pour les cytokines, d'autres voies d'activation cellulaire ont été décrites, en particulier la voie des « mitogen activated protein kinase » (MAPK) et la voie de la « phosphatidylinositol 3 kinase » (PI3K).

3. Les protéines adaptatrices et la famille des « mitogen activated protein kinase »

Les tyrosines des chaînes réceptrices, phosphorylées par les Jaks, sont également des sites d'ancrage pour les protéines de la voie Ras/MAPK. Ainsi les tyrosines phosphorylées Y⁷⁵⁹ et Y⁹⁷⁴, de gp130 et LIFR respectivement, permettent le recrutement de la protéine SHP2, qui ne semble pas être recrutée directement par OSMR (215). Néanmoins,

contrairement à gp130 et au LIFR, OSMR est capable de recruter la protéine adaptatrice « SH2 and collagen homology domain containing protein » (Shc). Des études de mutagenèse ont montré que cette protéine se fixe sur OSMR via la tyrosine intracellulaire Y⁸⁶¹ (223). Trois isoformes de cette molécule de transduction ont été décrites : il s'agit de p46 et p52 qui sont ubiquitaires, et de p66 qui est exprimée dans les cellules d'origine épithéliale (Figure 20).

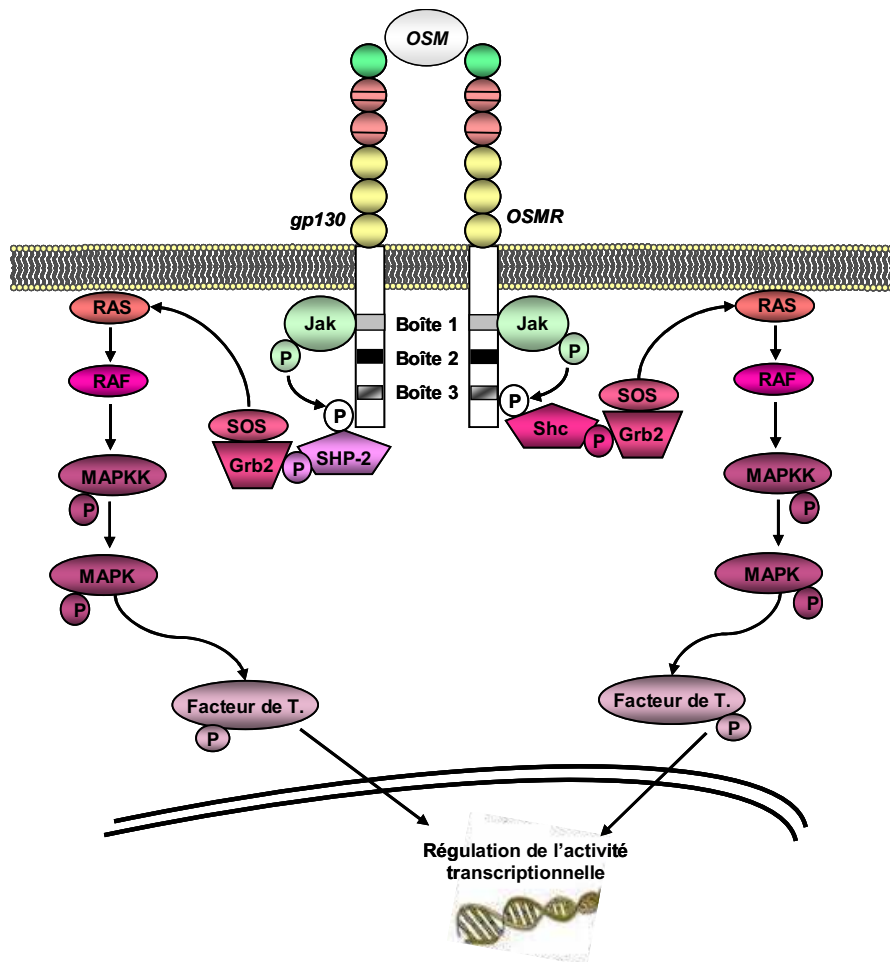


Figure 20 : Activation de la voie des MAPK par l'OSM.

SHP-2 est une protéine phosphatase ubiquitaire qui présente une masse moléculaire apparente de 65 kDa (215). Elle est constituée en N-terminal de deux domaines SH2 et d'un domaine tyrosine phosphatase en C-terminal (Figure 21). SHP-2 et Shc sont phosphorylées par les Jaks et recrutent alors le complexe « growth factor receptor bound protein 2 » (Grb2)/« son of sevenless » (SOS), permettant ainsi l'activation des protéines Ras et Raf. Cette dernière phosphoryle alors les « mitogen activated protein kinase kinases » (MAPKKs), aussi appelées MEKs ou MKKs, qui à leur tour phosphorylent les « mitogen activated protein kinases » (MAPKs) (224). La famille des MAPKs peut être divisée en deux catégories. D'une

part, les protéines ERKs pour « extracellular-regulated kinases », plus généralement appelées MAPKs, sont au nombre de trois : ERK1/2 et ERK 5. D'autre part, les SAPKs pour « Stress-activated protein kinases » comportent les protéines p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) et Jun amino-terminal kinases (JNK1/2/3). Les différents membres de la famille des MAPKs peuvent être activés par les cytokines de la famille de l'IL-6 mais les mécanismes conduisant à leur activation sont plus ou moins bien décrits. Les MAPKs phosphorylées migrent ensuite dans le noyau et, par l'intermédiaire de facteurs de transcription, elles peuvent réguler la transcription des gènes de la réponse immédiate tels que C-fos, jun-B et des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (203, 215, 225). L'activation de la voie des MAPKs induit la prolifération et la survie des cellules (226, 227) mais également leur migration par l'intermédiaire de Shc (228-230).

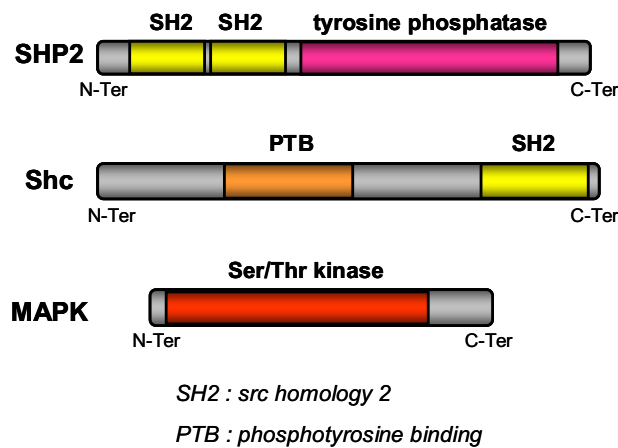


Figure 21 : Organisation structurale des MAPK et des protéines adaptatrices SHP2 et Shc.

4. Les protéines de la voie des « phosphatidyl inositol 3 kinase »

La protéine SHP-2 est également capable de recruter la voie PI3K/Akt. La « phosphatidyl inositol 3 kinase » (PI3K) est constituée de deux sous-unités : la sous-unité régulatrice appelée p85 et la sous-unité catalytique appelée p110. Les mécanismes conduisant au recrutement de la voie PI3K/Akt par gp130 ne sont pas encore bien décrits. Cependant, il a été démontré la formation d'un complexe entre SHP-2/Grb2-Sos et « Grb2-associated binder-1 » (Gab1) (203). Cette dernière est phosphorylée et recrute alors la sous-unité régulatrice de la PI3K. Cette interaction induit un changement conformationnel à l'origine de l'activation de la PI3K. Cette enzyme phosphoryle les lipides membranaires qui jouent alors le rôle de

seconds messagers. Ils servent de point d'ancrage à deux protéines kinases : Akt et « phosphoinositide-dependent kinase-1 » (PDK1). Ces deux protéines sont recrutées au niveau de la membrane plasmique et PDK1 phosphoryle Akt induisant ainsi son activation. Cette dernière est impliquée dans la survie et/ou la prolifération cellulaire.

5. La régulation négative de la signalisation intracellulaire

Afin d'éviter une stimulation excessive, la nature a mis au point des mécanismes sophistiqués pour éteindre la transduction du signal médiée par des cytokines.

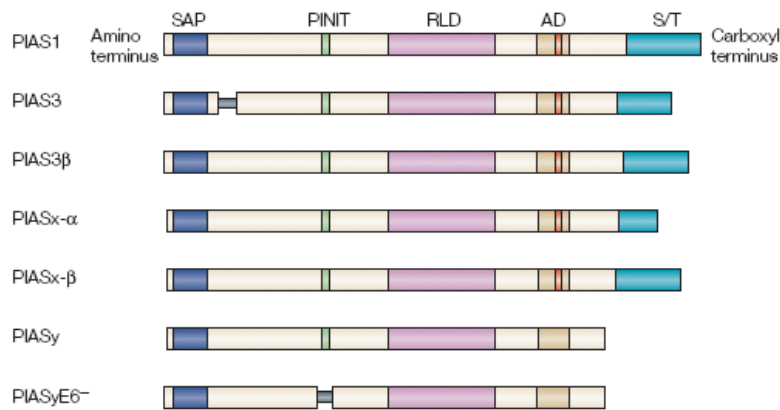
5.1. Les « protein tyrosine phosphatases » (PTPs)

Un mécanisme clé de la transduction du signal des cytokines de la famille de l'IL-6 est la phosphorylation des composants de la cascade de signalisation. Outre des protéines kinases, il est donc évident que des protéines phosphatases sont impliquées dans la régulation du signal. La première preuve de l'implication d'une PTP a été la mise en évidence du recrutement de la protéine SHP-2 sur le résidu Y⁷⁵⁹ de gp130 activé (211, 231).

La protéine SHP-2, aussi appelée « protein tyrosine phosphatase » (PTP1D), est constituée de deux domaines SH2 en N-terminal et d'un domaine phosphatase catalytique en C-terminal (Figure 21). La structure cristallographique de cette protéine suggère, qu'en absence de partenaire phosphorylé, un domaine SH2 en C-terminal recouvre le site actif et, par conséquent, l'activité catalytique est inhibée (232). La fixation des domaines SH2 à des motifs phosphorylés de récepteurs, ou de protéines adaptatrices, déplie la protéine induisant ainsi son activité enzymatique (233-235). SHP-2 est également activée lorsque ses résidus tyrosine 542 et/ou 580 du domaine C-terminal sont phosphorylés. Ces phosphotyrosines interagissent alors avec les domaines SH2 de la protéine libérant ainsi le domaine phosphatase (236). SHP-2 activée permet ainsi la déphosphorylation des résidus du domaine intracellulaire des chaînes transductrices du signal, des protéines Jaks et STATs. En effet, la surexpression d'un dominant négatif de SHP-2 conduit à une augmentation de la phosphorylation des chaînes réceptrices, des Jaks, des STATs et de SHP2 (237). L'implication d'autres phosphatases dans la signalisation médiée par les Jaks/STATs a été mise en évidence. Il s'agit des protéines PTP1B, CD45 et SHP1, mais leur mode d'action n'est pas encore élucidé.

5.2. Les « protein inhibitory of activated STAT » (PIAS)

La famille des PIAS comprend quatre membres : PIAS1, PIAS3, PIASx (PIAS2) et PIASy (PIAS4). A l'exception de PIAS1, deux isoformes de chaque protéine ont été identifiés. Ces protéines ont une forte homologie (>50%) et sont constituées de cinq domaines conservés (Figure 22) (238).



SAP: *scaffold-attachment factor A (SAFA) et SAFB, apoptotic chromatin-condensation inducer in the nucleus (ACINUS) et domaine PIAS*

PINIT: *motif d'acides aminés*

RLD: *RING-finger-like-zinc-binding domain*

AD: *domaine hautement acide*

S/T: *région riche en sérine et thréonine*

D'après Shuai K. et al., *Nat.Rev.Immunol.*, 2005 Aug;5(8):593-605.

Figure 22 : Organisation structurale des protéines de la famille des PIAS.

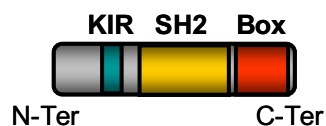
L'implication de chaque membre de cette famille a été démontrée dans la régulation de la signalisation des STATs. Des études ont mis en évidence la spécificité mais également la redondance des interactions PIAS/STAT. Il est intéressant de noter que les protéines PIAS interagissent uniquement avec les dimères des STATs, et pas avec les monomères, formés après leur phosphorylation par les protéines JAKs. Chaque membre de la famille des PIAS régule négativement l'activité des STATs auxquels il se lie. Ainsi, PIAS1, PIAS3 et PIASx interagissent avec STAT1, STAT3 et STAT4 respectivement (239-241). PIASy interagit également avec STAT1 (242). PIAS1 et PIAS3 bloquent la fixation sur l'ADN de STAT1 et STAT3 respectivement, réprimant ainsi leur activité transcriptionnelle. Le mécanisme détaillé de cette inhibition induite par les protéines PIAS n'est pas encore élucidé. Concernant PIASx et PIASy, leur mode d'action est différent puisqu'ils répriment l'activité transcriptionnelle, de STAT4 et STAT3 respectivement, en recrutant d'autres molécules co-répressives comme des

histones déacétylases (HDACs). La découverte de ces protéines PIAS met en évidence un mode d'inactivation directe des protéines de la famille des STATs. Ainsi, les protéines PIAS, constitutivement exprimées dans les cellules, agissent en régulant la concentration intracellulaire de protéines STATs activées.

5.3. Les « suppressor of cytokine signaling » (SOCS)

Un autre mécanisme de rétrocontrôle négatif de la voie Jak/STAT a été mis en évidence suite au clonage et à l'identification des protéines SOCS encore nommées Jak binding protein (JAB) ou STAT-induced STAT inhibitor (SSI) (243). Cette famille comprend huit membres : SOCS1 à SOCS7, et la protéine « cytokine inducible SH2 containing protein » (CIS). Contrairement aux protéines PIAS exprimées constitutivement dans les cellules, l'expression des SOCS est induite par différentes cytokines. En effet, l'IL-6 et le LIF induisent l'expression des protéines CIS, SOCS1, SOCS2 et SOCS3. L'IL-11 induit seulement l'expression de SOCS3. Quant à l'OSM, il induit l'expression de CIS, de SOCS1 et de SOCS3 (244-247). Les promoteurs de nombreux SOCS contiennent des sites de fixation des STATs (246).

Ces protéines sont constituées d'un domaine SH2 central encadré, en N-ter, par un domaine inhibiteur de l'activité kinase (KIR) et en C-ter par une boîte SOCS (Box) (Figure 23).



KIR : Kinase inhibitory region

SH2 : Src homology 2

Figure 23 : Organisation structurale des protéines de la famille des SOCS.

La boîte SOCS est un module de 40 aminoacides qui permet l'interaction avec la protéine « E3-ubiquitine transferase ». Ainsi, les SOCS seraient impliquées dans la dégradation, par ubiquitinylation, des protéines auxquelles elles s'associent. En plus de leur capacité à induire cette dégradation, SOCS1 et SOCS3, peuvent également inhiber l'activité des protéines JAKs de façon directe par l'intermédiaire de leur domaine KIR. Ce domaine est qualifié de « pseudo-substrat » important pour la suppression de la signalisation induite par

les cytokines. En effet, des études *in vitro* ont montré que le domaine KIR de SOCS1 interagit avec le domaine kinase JH-1 de la protéine Jak2 inhibant ainsi son activité catalytique (248). Quant à SOCS3, bien qu'elle se fixe également aux protéines Jaks et qu'elle contienne un domaine KIR, son mode d'action principal consiste à s'associer aux résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs de cytokines activés, comme gp130 (249, 250). De même que la protéine SHP2, SOCS3 se lie à gp130 par l'intermédiaire du résidu Y⁷⁵⁹. Le mécanisme exact par lequel SOCS3 agit n'est pas totalement élucidé. En effet, de façon similaire à SOCS1, il a également été démontré que SOCS3 pouvait se lier à la boucle d'activation de Jak2 par l'intermédiaire de son domaine SH2. Cependant, le mode d'action de ces deux protéines reste différent et reflète ainsi le fait que SOCS1 soit plus efficace pour bloquer l'activité des Jaks (251).

5.4. Autres systèmes de modulation de la transduction du signal

Les cytokines peuvent réguler négativement l'expression de leurs propres récepteurs. En effet, la fixation de l'IL-6 sur son récepteur entraîne une internalisation du complexe et donc une diminution de l'expression du récepteur à la surface cellulaire. La voie du protéasome semble également être impliquée dans la régulation négative du signal intracellulaire. Ce phénomène a été mis en évidence pour l'EPO et son récepteur. En effet, la protéine CIS est une protéine ubiquitinylée qui, en s'associant au récepteur, permet la dégradation de ce complexe par la voie du protéasome. De plus, des inhibiteurs du protéasome entraînent une prolongation de la phosphorylation des STATs et du récepteur en réponse à l'EPO. Cette voie permet alors de réguler la durée du signal intracellulaire induit par l'EPO en diminuant le nombre de récepteurs à la surface cellulaire (252, 253). En ce qui concerne les cytokines de la famille de l'IL-6, une régulation de même type a été mise en évidence. En effet, après stimulation avec de l'OSM, les chaînes gp130, LIFR et OSMR sont ubiquitinylées et dégradées par la voie du protéasome (244). Cependant, les complexes cytokine/récepteur sont généralement dégradés par la voie lysosomale (254, 255). Ce mécanisme de régulation négative fait intervenir le domaine intracellulaire de gp130. En effet, des motifs « dileucine like » ont été identifiés au niveau de gp130 mais également du LIFR (255, 256). Ces motifs sont nécessaires pour l'internalisation du récepteur induite par la fixation du ligand. Cependant, l'internalisation de gp130 semble être indépendante de la fixation du ligand mais elle est modulée par la phosphorylation du résidu Ser⁷⁸² qui est adjacent au motif dileucine (256, 257). Cette phosphorylation est induite par les MAPKs.

Une autre voie de modulation de l'activité des cytokines consiste à réguler la stabilité de leurs ARNs messagers, dont la demie vie est courte (203). Différentes voies de signalisation sont impliquées dans ce mécanisme de stabilisation. Il s'agit des voies des MAPKs et de la PI3K. Le mécanisme exact, par lequel ces voies de signalisation influencent la stabilité des ARNm, n'est pas encore élucidé. Seule, l'importance des régions riches en motifs AU a été mise en évidence. De même, la demie vie des protéines de signalisation est impliquée dans la modulation de la réponse aux cytokines. Ainsi, la demie-vie des protéines SOCS est très courte (1 à 2 heures) permettant un recyclage rapide. Par conséquent, ces protéines sont disponibles en permanence et régulent négativement les voies de signalisation afin de limiter la réponse aux cytokines. A l'inverse, la demie-vie des protéines STATs est beaucoup plus longue (8 à 16 heures) limitant ainsi leur recyclage et donc leur disponibilité.

La mise en évidence de ces protéines agissant à divers niveaux de la cascade d'activation intracellulaire en réponse à une cytokine, laisse entrevoir la complexité et la précision de ce réseau. Il est probable qu'un équilibre entre activation et inactivation du signal intracellulaire soit à l'origine de la précision de la réponse biologique cellulaire. Il existe un autre mécanisme de régulation de l'activité des cytokines : il s'agit de formes solubles des récepteurs de ces cytokines. Ce mécanisme est présenté plus en détails dans le chapitre 3.

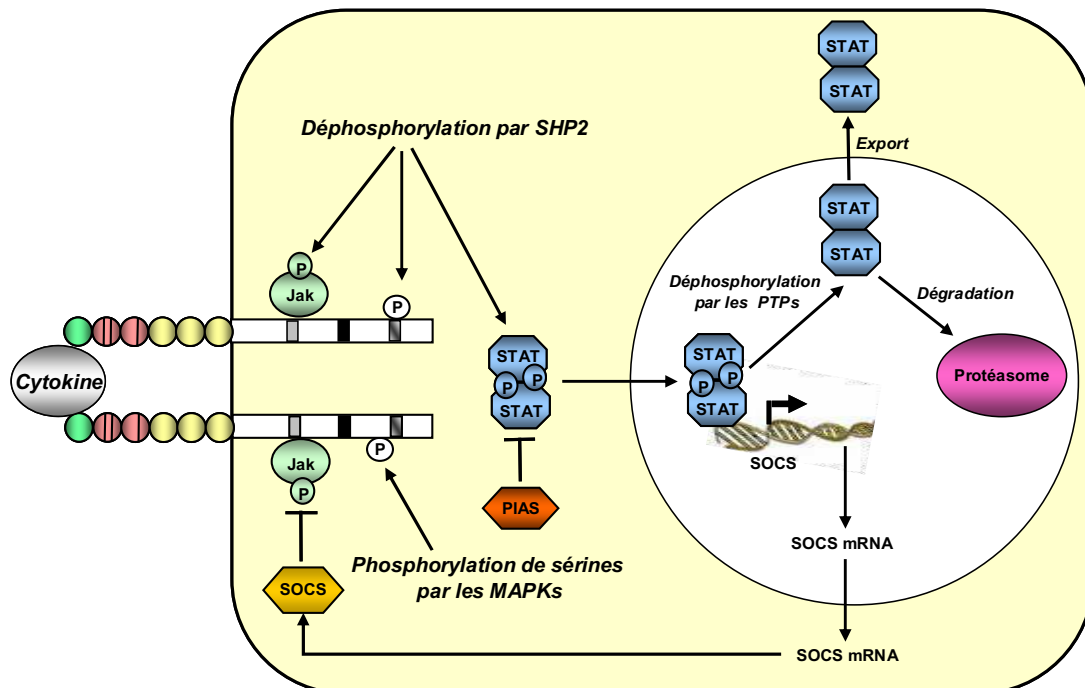


Figure 24 : Voies de régulation négative de la signalisation cellulaire induite par les cytokines de la famille de l'IL-6

Chapitre 3

Implication des cytokines de la famille de l'IL-6 dans des pathologies

1. Cytokines de la famille de l'IL-6 et système cutané

1.1. OSM et inflammation cutanée : implication dans le psoriasis

L'OSM est connue pour être un médiateur proinflammatoire et récemment, cette activité pro-inflammatoire a été mise en évidence au niveau de la peau. Des études ont démontré la présence d'OSM dans différentes conditions pathologiques au niveau de la peau telles que des lésions psoriasiques, des kératoacanthomes ou des carcinomes spinocellulaires (258-260). De plus, l'OSM est un facteur autocrine essentiel pour les cellules de sarcome de Kaposi. Ainsi, une première étude a été réalisée afin d'analyser les réponses transcriptionnelles induites par l'OSM dans des cultures primaires de kératinocytes (261). Ce même groupe a étudié les effets de l'OSM sur des épidermes reconstitués (262). En parallèle à cette étude, nous avons également analysé l'effet de l'OSM sur la peau (263). Nous avons d'abord démontré que les kératinocytes expriment le récepteur fonctionnel de type II de l'OSM mais pas le récepteur de type I, partagé avec le LIF. Ainsi, les différentes voies de signalisation activées par l'OSM, dans les kératinocytes, ne sont pas activées *via* le LIFR β . En effet, le LIF n'est pas capable d'induire l'activation de ces cellules. L'analyse du profil transcriptionnel induit par l'OSM, dans les kératinocytes et les épidermes reconstitués, montre une implication de cette cytokine dans la régulation des mécanismes d'adhésion, d'angiogénèse, d'immunité innée et de la réponse inflammatoire (261, 263). En effet, l'OSM stimule fortement l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire, les défenses anti-microbiennes ou associées au chimiotactisme. A l'inverse, l'OSM inhibe l'expression de gènes associés à la différenciation des kératinocytes, tels que la CK1, la CK10 ou la filagrine. Ces résultats confirment les études précédentes selon lesquelles l'OSM module l'expression de gènes impliqués dans l'immunité innée, l'angiogénèse, l'adhésion, la mobilité, le remodelage tissulaire, le cycle cellulaire et la transcription. Dans ces études, ils ont également mis en évidence l'inhibition des marqueurs de différenciation et l'induction des protéines de la famille S100A en réponse à l'OSM (262). Une surexpression des membres de cette famille, en particulier la protéine S100A7 (psoriasine) est détectée chez des patients atteints de psoriasis. Enfin, l'OSM augmente l'expression du VEGF, suggérant un rôle dans l'angiogénèse. De plus, l'étude de l'activité de l'OSM dans un modèle de

cicatrisation *in vitro* et dans des épidermes reconstitués met en évidence une migration des kératinocytes et une hyperplasie des épidermes reconstitués induites par cette cytokine. D'autres études confirment l'implication de l'OSM dans la réponse inflammatoire *in vivo*. En effet, il a été mis en évidence qu'une injection sous-cutanée d'OSM génère un érythème et un oedème chez la souris ainsi qu'une vasodilatation et une infiltration de leucocytes (264).

L'ensemble de ces données suggèraient l'implication de l'OSM dans l'inflammation cutanée et par conséquent, son implication dans des pathologies cutanées telles que le psoriasis. Le psoriasis est l'une des pathologies cutanées chroniques les plus répandues. 2% de la population mondiale souffre de cette pathologie. Les causes de cette maladie sont toujours inconnues mais elles semblent résulter de prédispositions génétiques et également de facteurs environnementaux, tels que le stress ou les infections. La pathogénèse du psoriasis est sous la dépendance de cellules de l'immunité activées, telles que les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les macrophages. De plus, les médiateurs pro-inflammatoires -notamment des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance- créent un environnement inflammatoire et stimulent la prolifération des kératinocytes et des cellules endothéliales. Les lésions cutanées de patients psoriasiques sont érythémato-squameuses et sont caractérisées par un épaissement de l'épiderme résultant d'une hyperprolifération et d'une différenciation anormale des kératinocytes (Figure 25).

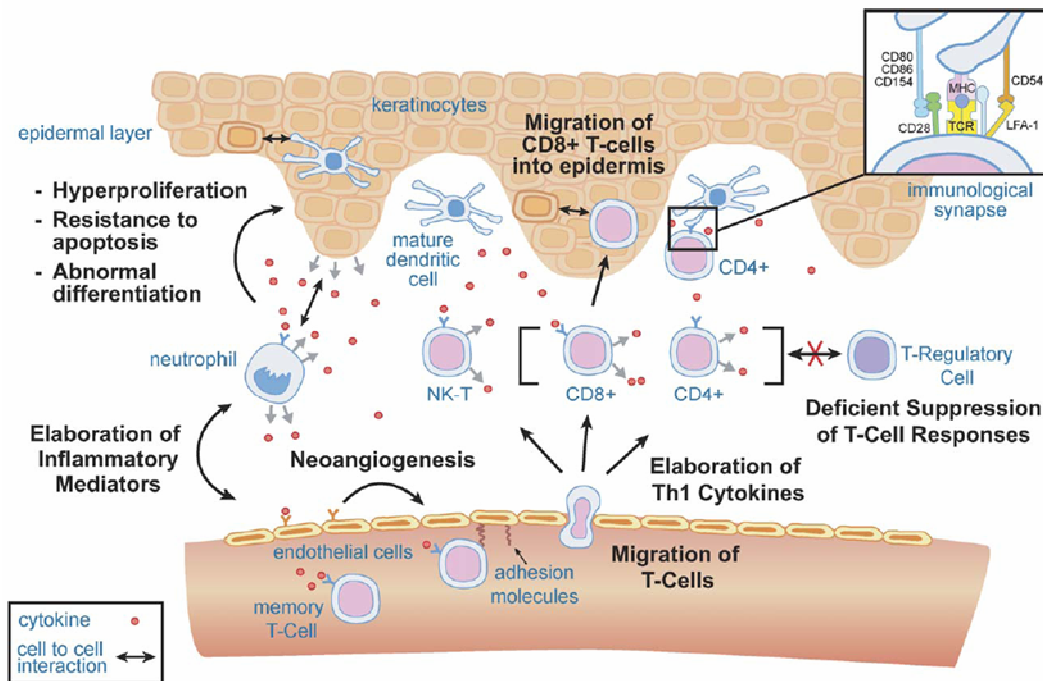


Figure 25 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du psoriasis.

(D'après Gaspari, AA et al., *J.Am.Acad.Dermatol.*, 2006).

Une surexpression de la protéine S100A7 –aussi appelé psoriasine- est observée dans les lésions cutanées de ces patients. De même, une surexpression des chaînes OSMR β et gp130 est retrouvée chez ces patients comparés à des sujets sains (263). De plus, l'OSM est détectée dans les lésions psoriasiques alors qu'elle n'est pas ou très peu détectée dans la peau saine. L'analyse des lymphocytes T infiltrant les lésions montre qu'ils produisent des quantités d'OSM plus importantes que les lymphocytes T périphériques issus de mêmes patients ou de sujets sains. Ces lymphocytes T représentent donc une source importante d'OSM *in situ* mais il n'est pas exclu que d'autres cellules de la peau –telles que les kératinocytes, les monocytes et les neutrophiles- produisent également de l'OSM. D'autre part, des études cliniques ont mis en évidence des concentrations d'OSM plus élevées dans les surnageants de culture de biopsies de lésions cutanées psoriasiques comparées à des peaux non lésées ou saines (259). L'OSM pourrait ainsi être impliqué dans l'exacerbation de la réponse inflammatoire cutanée observée dans les lésions psoriasiques. Ces données sont corrélées avec une étude montrant que des souris transgéniques surexprimant STAT3 au niveau de la peau développent des lésions cutanées similaires à celles observées dans le psoriasis (265). La formation de ces lésions chez ces animaux est dépendante de l'activation de STAT3 dans les kératinocytes et de la présence de lymphocytes T activés. Or, nous venons de démontrer que l'OSM est produite par les lymphocytes T infiltrants et qu'elle induit l'activation de STAT3. Ces observations apportent donc de nouvelles preuves de l'implication de l'OSM dans le psoriasis.

Dans l'étude du groupe de Miroslav Blumenberg, l'OSM semble exercer des activités pro- et anti-inflammatoires au niveau de la peau. Les effets anti-inflammatoires observées impliquent la suppression des molécules de signalisation type Th1 et l'induction de l'IL-4, une cytokine de type Th2. Or, le psoriasis est une maladie de type Th1 et l'OSM pourrait ainsi inhiber les réponses Th1 impliquées dans cette pathologie. De plus, elle inhibe également des protéines impliquées dans la voie IL-1 et ils suggèrent ainsi qu'elle pourrait jouer un rôle dans la suppression des processus inflammatoires psoriasiques. Selon leurs hypothèses, l'OSM pourrait ainsi être impliquée dans la réduction de la progression de la maladie. Cependant les facteurs d'induction ou de répression observés sont relativement faibles et aucune donnée n'a été confirmée au niveau protéique. De plus, connaissant l'implication de nombreuses cytokines dans le psoriasis, nous avons testé 33 cytokines sur les kératinocytes et mis en évidence une activité prépondérante de l'OSM en synergie avec le TNF- α et l'IL-17. Ces deux cytokines sont déjà décrites pour leurs effets proinflammatoires sur les kératinocytes et leur expression dérégulée dans le psoriasis (263, 266). Ces données contribuent à mieux

comprendre le réseau cytokinique complexe impliqué dans la régulation de l'inflammation observée dans le psoriasis, et à identifier des cibles potentielles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Et enfin, une étude récente démontre l'implication de l'OSMR β dans une autre pathologie cutanée : l'amylose cutanée primaire localisée ou lichen amyloïde (267). Il s'agit d'une maladie autosomale dominante caractérisée par une éruption persistante, prurigineuse, papuleuse que l'on retrouve plus particulièrement sur les tibias. Celle-ci est provoquée par un dépôt de substance amyloïde dans le derme papillaire. Les lésions se composent de papules multiples, squameuses et souvent pigmentées et peuvent également se présenter sur les extenseurs des cuisses, des avant-bras et de la partie supérieure des bras. En recherchant des gènes candidats chez des patients atteints de lichen amyloïde, ils ont identifié deux mutations faux-sens au niveau de l'OSMR. Ces mutations sont situées un niveau des domaines FnIII et une des mutations entraîne une inhibition de la signalisation induite par l'OSM. Cette mutation est située sur un domaine FnIII et pourrait donc interférer dans l'hétérodimérisation de l'OSMR avec gp130. En effet, des études de mutagenèse dirigée sur gp130 ont déjà démontré l'importance des domaines FnIII dans la dimérisation avec gp130 ou LIFR. Cependant des études supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre la corrélation entre cette maladie et les mutations. Cela permettra ainsi de déterminer le rôle exact de l'OSM dans cette maladie et également d'étendre l'étude à d'autres pathologies cutanées.

L'ensemble de ces données met en évidence une implication de l'OSM au niveau de la peau et plus particulièrement dans l'inflammation cutanée. De façon similaire, l'IL-31 présente également un tropisme cutané.

1.2. IL-31 et dermatite atopique

Des souris transgéniques surexprimant l'IL-31 développent un prurit, une hyperkératinose, une alopecie ainsi que des lésions cutanées caractérisées par une infiltration de cellules inflammatoires et de mastocytes (175). Un phénotype similaire est observé chez des patients atteints de dermatite atopique. Il s'agit d'une pathologie cutanée inflammatoire chronique qui affecte 10 à 20% des enfants dans le monde. Les symptômes peuvent persister, ou débiter, à l'âge adulte. Cette maladie est la résultante de différents paramètres : des gènes de susceptibilité, des facteurs environnementaux et immunologiques. Deux types de dermatite atopique sont définis : la forme extrinsèque associée à une sensibilisation médiée par les IgE et la forme intrinsèque avec absence de sensibilisation médiée par les IgE. Les souris

transgéniques surexprimant l'IL-31 ne présentent pas de taux d'IgE élevés et par conséquent, cette cytokine pourrait être associée à la forme intrinsèque de la maladie.

La dermatite atopique est caractérisée par deux phases : une phase aiguë et une phase chronique (Figure 26). La phase aiguë, dite « de type Th2 », est caractérisée par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les lymphocytes Th2 infiltrants l'épiderme. A l'inverse, la phase chronique, dite « de type Th1 », est caractérisée par une production importante d'IFN γ dans ce même tissu (268).

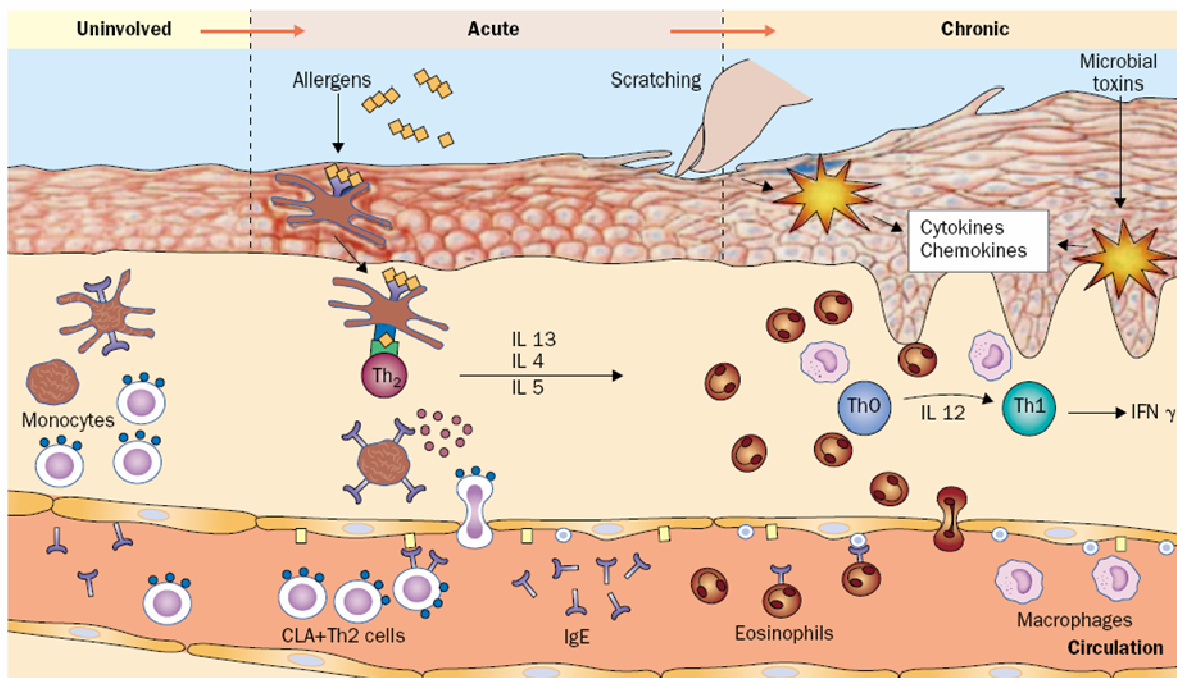


Figure 26 : Voies immunologiques impliquées dans la dermatite atopique

(D'après Leung, DYM et al., *The Lancet*, 2003).

D'autre part, cette pathologie est caractérisée par l'infiltration d'un type cellulaire particulier : les lymphocytes Th2 mémoires exprimant le « cutaneous lymphocyte antigen » (CLA+). L'implication de ces cellules a déjà été démontrée dans plusieurs maladies caractérisées d'« atopiques » (269). En effet, il a été démontré que ces cellules répondent de manière exacerbée aux allergènes comparées aux cellules CLA- (270). De plus, cette sous-population lymphocytaire T est majoritaire au niveau des sites cutanés inflammatoires alors qu'elle représente seulement 15% des lymphocytes T périphériques. Or, l'IL-31 est produite par ces cellules et les lymphocytes T mémoires CLA+ circulants de patients atteints de dermatite atopique semblent produire plus d'IL-31 que ceux atteints de psoriasis ou ceux de sujets sains (269). D'autres études confirment l'implication de l'IL-31 dans la dermatite

atopique chez la souris mais aussi chez l'homme. En effet, une surexpression d'IL-31 est retrouvée au niveau de la peau des souris NC/Nga, un modèle de dermatite atopique, lorsqu'elles développent la maladie (271, 272). L'équipe de Bernhard Homey décrit l'IL-31 comme un nouveau lien entre les cellules T et le prurit au niveau de l'inflammation cutanée atopique. En effet, l'IL-31 est significativement augmentée chez des patients présentant une inflammation cutanée pruritique comparés à des patients atteints d'une inflammation cutanée non pruritique (273). Ainsi, l'IL-31 serait à l'origine des sensations de démangeaison dans cette pathologie. Cette expression d'IL-31 est également corrélée avec l'expression d'IL-4 et d'IL-13, deux cytokines de type Th2 impliquées dans de nombreuses maladies inflammatoires (274). Plus récemment, une étude génétique a permis la mise en évidence d'un haplotype particulier de l'IL-31 associé à de l'eczéma de type non atopique (275). Et de manière similaire à l'OSM, l'interleukine-31 pourrait être impliquée dans le lichen amyloïde (267). En effet, la mutation observée sur l'OSMR entraîne une inhibition de la signalisation cellulaire induite par l'OSM mais également celle induite par l'IL-31.

L'IL-31 est une cytokine récemment identifiée et par conséquent, encore mal connue. Cependant, les premières études réalisées mettent clairement en évidence son tropisme cutané et son implication dans des pathologies cutanées. D'autres résultats préliminaires mettent également en évidence une implication de l'IL-31 dans d'autres pathologies allergiques telles que l'asthme (179, 275-278).

1.3. Implication des autres membres de la famille de l'IL-6 au niveau cutané

Les cytokines de la famille de l'IL-6 exercent des effets pléiotropes et redondants mais toutes n'ont pas d'activité au niveau de la peau. Hormis l'OSM et l'IL-31, seuls l'IL-6, le LIF et l'IL-11 sont connus pour avoir des effets au niveau de la peau et/ou dans des pathologies cutanées inflammatoires.

1.3.1. L'IL-6

Les données de la littérature concernant les effets *in vitro* de l'IL-6 seule sur la prolifération des kératinocytes sont contradictoires (279, 280). Cependant, il est démontré que l'IL-6 potentialise la prolifération des kératinocytes, induite par l'Epidermal Growth Factor (EGF), en augmentant l'expression du récepteur de ce facteur de croissance (280). Ces résultats sont confirmés *in vivo* par injection intradermique chez le rat d'un plasmide codant pour l'IL-6 humaine. Cette injection induit la surexpression d'IL-6 par les kératinocytes, la

formation d'un érythème, un épaissement de l'épiderme et une infiltration de lymphocytes T (281). Une surexpression de TGF- α est également observée. Or, cette cytokine induit également une hyperprolifération et un épaissement de la peau (282). Dans un modèle de xénogreffe de peau humaine sur des rats immunodéficients, la surexpression d'IL-6 dans des kératinocytes induit une augmentation de leur prolifération, et par conséquent un épaissement de l'épiderme, ainsi que l'infiltration de lymphocytes (281, 283). Des souris transgéniques exprimant constitutivement l'IL-6 au niveau de la peau sont de taille inférieure, présentent des zones cutanées desquamées, une croissance du poil retardée et une couche cornée épaissie (284). Dans ce modèle, l'IL-6 ne semble pas avoir d'effet sur la prolifération des kératinocytes et sur l'infiltration de leucocytes. En effet, l'expression des kératines K14 (marqueur de prolifération) et K10 (marqueur de différenciation) n'est pas modulée dans ces souris. Même si certains résultats sont contradictoires, l'ensemble de ces données suggère une implication de l'IL-6 dans le développement d'un phénotype inflammatoire cutané ressemblant à celui observé chez des patients atteints de psoriasis.

Les concentrations d'IL-6 sérique, sécrétée *in vitro* par les cellules mononucléées de sang périphérique de patients atteints de psoriasis, sont plus élevées que celles de sujets sains ou atteints de dermatite atopique (285, 286). De même, l'expression de l'IL-6 est augmentée dans les lésions de patients psoriasiques comparées à de la peau non lésée des mêmes patients ou de sujets sains. Les kératinocytes, les cellules endothéliales et les leucocytes infiltrant le derme semblent être les principales sources de cette cytokine (279, 286). D'autre part, l'expression d'IL-6 est diminuée après traitement des patients par des corticoïdes parallèlement à la diminution de l'épaisseur de l'épiderme et du nombre de cellules inflammatoires infiltrantes (279, 287).

1.3.2. Le LIF

Le LIF semble être principalement exprimé par les kératinocytes des couches supra-basales de l'épiderme mais il n'est pas détecté dans le derme. Les kératinocytes expriment l'ARNm codant pour le LIF et pour son récepteur. Le niveau d'expression du LIF pourrait être associé au stade de différenciation des kératinocytes car il est augmenté en présence de fortes concentrations d'un inducteur de la différenciation : le calcium. Quant à sa production par les kératinocytes, elle est augmentée par l'IL-1 α ou l'IL-8. Le LIF augmente, à son tour, la production de ces deux cytokines pro-inflammatoires. Cependant, il n'a aucun effet sur la production de TNF- α et d'IL-6 (288). Ces données suggèrent une implication du LIF dans la

régulation de l'inflammation cutanée. Une étude *in vivo*, chez la souris, a confirmé cette hypothèse. En effet, une injection sous-cutanée de LIF chez la souris induit un gonflement et une accumulation de leucocytes (289). Cependant, une autre étude démontre un effet anti-inflammatoire du LIF dans un modèle murin d'inflammation induite par l'adjuvant de Freund. Le LIF diminue alors l'œdème induit par cet adjuvant, l'infiltration de cellules inflammatoires, notamment de macrophages, et l'expression d'IL-1 β (290).

L'expression de l'ARNm codant pour le LIF est augmentée dans certaines pathologies inflammatoires cutanées comme la dermatite atopique, les carcinomes de la peau et le psoriasis (291-293). Les concentrations de LIF sont plus importantes dans les surnageants de culture de biopsies de lésions psoriasiques comparées à des peaux non lésées des mêmes patients ou de peaux saines (259). De plus, le LIF stimule l'hyperprolifération de kératinocytes humains *in vitro* dans un modèle d'épiderme reconstitué et une surexpression de cette cytokine a été observée dans l'épiderme hyperprolifératif de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (294). Une autre corrélation, observée entre le LIF et l'hyperprolifération des kératinocytes, est l'induction de la kératine-17 par le LIF. Cette protéine est impliquée dans la cicatrisation et dans l'hyperprolifération des kératinocytes (295, 296). L'ensemble de ces données suggère une implication du LIF dans les pathologies cutanées caractérisées par une hyperprolifération de l'épiderme.

1.3.3. L'IL-11

L'expression d'IL-11 est augmentée dans les lésions cutanées chroniques de patients atteints de dermatite atopique, parallèlement à l'augmentation du dépôt de collagène observé dans cette maladie. L'IL-11 semble être produite par les éosinophiles infiltrés dans les lésions (297). Les concentrations d'IL-11 sont plus importantes dans les surnageants de culture de biopsies de lésions psoriasiques que dans ceux de peaux asymptomatiques des mêmes patients ou de peaux saines (258). Cependant, le niveau d'expression de l'ARNm codant pour l'IL-11 est similaire dans les peaux lésées ou asymptomatiques de patients atteints de psoriasis (298).

Compte tenu de ses propriétés anti-inflammatoires, l'IL-11 a été testée pour traiter des patients atteints de psoriasis. Un essai clinique de phase I, réalisé sur 12 patients traités pendant 8 semaines avec des injections sous-cutanées journalières d'IL-11, montre une amélioration clinique chez 7 patients avec une diminution des érythèmes, de la desquamation et des indurations cutanées. De plus, l'IL-11 induit une diminution de l'épaisseur de l'épiderme *in vivo*, associée à une réduction de la prolifération des kératinocytes, ainsi qu'une diminution de l'infiltrat de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Elle diminue également

l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , l'IL-12, l'IL-1 β , IL-8 et TNF- α , et de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (298).

L'ensemble de ces données montre que l'IL-6, le LIF, l'IL-11, l'OSM et l'IL-31 sont impliquées à différents niveaux dans la régulation de l'inflammation cutanée. L'IL-6, le LIF, l'OSM et l'IL-31 semblent exercer une activité pro-inflammatoire au niveau de la peau. A l'inverse, l'IL-11 apparaît comme une cytokine anti-inflammatoire.

2. Cytokines de la famille de l'IL-6 et cancer

2.1. Les cytokines à activité pro-tumorale

2.1.1. L'IL-6

L'IL-6 joue un rôle majeur dans le développement de cancers en favorisant la croissance tumorale. En effet, elle inhibe l'apoptose des cellules tumorales et elle favorise l'angiogénèse tumorale (299). Elle semble être impliquée dans la régulation de la croissance tumorale de manière paracrine et autocrine. Elle participe à la croissance de certaines cellules cancéreuses, telles que des cellules de cancers colorectaux, et en particulier à un stade avancé. La concentration d'IL-6 peut dépendre du stade de la tumeur et elle peut ainsi être corrélée au taux de survie des patients. Plusieurs études se sont ainsi focalisées sur l'utilisation de l'IL-6 comme facteur pronostic dans le cancer. En effet, les concentrations sériques en IL-6 sont généralement élevées dans de nombreux cancers (cancers de l'endomètre, des poumons, du sein, colorectaux, ovariens et rénaux). De plus, une surexpression d'IL-6 et de son récepteur soluble (IL-6Rs) est retrouvée dans des carcinomes mammaires et des cancers de la prostate. Les concentrations d'IL-6 et de son récepteur sont alors corrélées avec le grade histologique de la maladie.

Une production autocrine d'IL-6, par des cellules de carcinome du sein, a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*. Une concentration sérique élevée d'IL-6 est retrouvée chez des patientes atteintes de carcinomes du sein à un stade avancé et présentant des métastases au niveau du foie. Cette concentration élevée est associée à une survie plus courte comparée à des patientes présentant des concentrations d'IL-6 moins élevée. De plus, une corrélation entre le taux d'IL-6 et de « C-reactive protein » (CRP), marqueur de l'inflammation, a été

observée dans ce type de cancer mais également dans d'autres cancers comme le cancer du colon.

De même, une corrélation entre les concentrations d'IL-6 et le stade du cancer a été démontrée dans le cas de cancers de l'estomac. Des études démontrent l'implication de l'IL-6 dans la progression de ce cancer mais également dans l'invasion des cellules cancéreuses au niveau des ganglions lymphatiques et dans le développement des métastases. Ces résultats confirment le rôle de l'IL-6 comme facteur pronostic. De plus, il a été démontré une implication de IL-6 dans l'angiogénèse *via* l'induction de la production de VEGF. Elle pourrait ainsi favoriser la croissance de la tumeur.

L'implication de l'IL-6 dans le développement du cancer pancréatique a également été étudiée. Elle peut être sécrétée par les cellules tumorales pancréatiques grâce à des mécanismes autocrine et paracrine, et il a été démontré une association entre la concentration sérique d'IL-6 et le stade du cancer chez des patients présentant une cachéxie. Un traitement avec des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL-6 conduit à une réduction des symptômes cliniques chez des patients présentant des taux élevés d'IL-6.

Le rôle de l'IL-6 dans la pathogénèse de leucémies et de lymphomes est bien décrit. En effet, cette glycoprotéine est un facteur de stimulation des cellules B et intervient dans leur différenciation. Elle induit également la croissance de cellules B dans la cas de lymphomes. Des concentrations sériques d'IL-6 élevées sont observées chez des patients atteints de lymphomes confirmant ainsi le rôle de l'IL-6 comme facteur pronostic négatif. De plus, l'IL-6 joue un rôle majeur dans le développement de myélome multiple. En effet, cette cytokine est un facteur de croissance pour les plasmocytes et les hybridomes dérivés de cellules B. La concentration élevée en IL-6, chez des patients atteints de ce cancer, continue à augmenter avec la progression de la maladie. Des études récentes ont montré que l'IL-6 pouvait être une cible dans le traitement de myélome multiple basé sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'IL-6 et son récepteur.

2.1.2. Le LIF

Comme l'IL-6, le LIF induit la différenciation de la lignée monocyttaire M1, et il est exprimé dans de nombreux cancers. En effet, son expression est détectée *in vitro*, par Northern-blot, dans des lignées de carcinomes dérivés du pancréas, du poumon, de l'estomac, du colon, du sein, de mélanocytes, du foie et de la vésicule biliaire. Son récepteur est également exprimé par ces cellules suggérant la possibilité d'une stimulation autocrine et/ou paracrine des cellules cancéreuses par le LIF. Certains résultats suggèrent une interaction

entre les macrophages infiltrant les tumeurs et les cellules de sarcomes afin d'augmenter la sécrétion de LIF par les cellules tumorales. Et très récemment, il a été démontré un rôle du LIF et de l'IL-6 dans la génération de macrophages associés aux tumeurs (MATs) à partir de monocytes. Ces MATs sont des cellules immunosuppressives présentes en grand nombre dans le microenvironnement tumoral. Par conséquent le LIF et l'IL-6, contenus dans ce microenvironnement, favoriseraient l'acquisition d'une tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales (300). Ces résultats confirment une étude précédente dans laquelle la transfection de cellules cancéreuses avec du LIF prévenait le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale (301).

Le LIF est impliqué dans le développement tumoral et peut agir comme facteur de croissance sur certaines lignées tumorales. En ce qui concerne le cancer du sein, le LIF et son récepteur sont exprimés dans la plupart des lignées de cancer du sein. Ainsi, de nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre le rôle du LIF dans ce cancer. Aucune implication du LIF n'a pu être démontrée de manière irréfutable même si certaines études suggèrent un effet stimulateur et paracrine du LIF sur des lignées de cancer de sein. Par ailleurs, le LIF stimule indirectement la prolifération d'ostéoclastes et la résorption osseuse. Il a ainsi été suggéré que le LIF, dérivé de cellules cancéreuses du sein, pourrait favoriser le développement de métastases osseuses. Cependant, aucune étude à ce jour n'a confirmée cette hypothèse.

Le LIF semble également être impliqué dans le développement de tumeurs au niveau de la peau (291). En effet, il est sécrété par des cellules de carcinomes de la peau et il induit la croissance tumorale par des mécanismes directs et indirects. Il stimule la prolifération de kératinocytes tumoraux et il active la sécrétion d'IL-8 qui stimule également leur prolifération. Il semble également exercer un rôle immunosuppresseur en induisant la sécrétion d'IL-10, inhibant ainsi les réponses Th2 et favorisant la croissance de la tumeur.

Le LIF induit une perte de poids et une cachexie *in vivo*. Ces symptômes sont associés aux maladies inflammatoires, aux infections chroniques et au cancer. Le mécanisme à l'origine de ces effets du LIF est une diminution de l'activité lipase des adipocytes. Ces effets ne sont pas spécifiques du LIF et ils peuvent être induits par d'autres cytokines comme l'IL-1 ou le TNF- α . Cependant, des concentrations sériques élevées de LIF ont été observées chez des patients atteints de cancers –en particulier de lymphomes (302)- et de nombreuses lignées tumorales sécrètent du LIF : il représente donc un facteur potentiellement inducteur de cachexie chez ces patients. Cet effet du LIF a été confirmé *in vivo* dans un modèle de greffe sur des souris Nude en utilisant la lignée de mélanome SEKI (291). Cette lignée produit du

LIF à l'origine d'une cachexie sévère chez les souris greffées. Le taux de LIF secrété apparaît comme régulateur de la tumorigénicité. D'autres études sur des souris Nude, injectées avec des cellules de carcinomes de colon produisant du LIF, ont démontré une corrélation entre la tumorigénicité et le taux de LIF. En effet, l'inhibition de la production de LIF par les cellules de carcinomes induit une diminution du nombre de tumeurs.

2.2. Les cytokines à propriétés anti-tumorales

2.2.1. L'IL-27

L'IL-27 représente un intérêt considérable comme agent anti-cancéreux du fait de ses similarités avec l'IL-12 (192). Cette dernière est connue pour son efficacité contre les tumeurs car elle favorise la polarisation Th1 et par conséquent, les réponses immunitaires cellulaires et la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques. La surexpression d'IL-27 dans des cellules de carcinome de colon, des néoblastomes ou des mélanomes transplantées chez la souris, inhibe la croissance de la tumeur. De plus, dans la plupart des cas, les souris hôtes sont également protégées contre les cellules cancéreuses parentales non transfectées injectées simultanément au niveau d'un autre site ou injectées après la régression complète des tumeurs initiales surexprimant l'IL-27. Les splénocytes de ces souris produisent des quantités élevées d'IFN γ lorsqu'ils sont stimulés à nouveau avec la lignée cellulaire parentale. De plus, leur activité cytolytique contre les cellules parentales est augmentée. Ces résultats suggèrent donc le développement d'une mémoire immunologique, contre les cellules tumorales, lors de l'expression de l'IL-27.

L'objectif de certaines études consistait à identifier les cellules responsables de la protection induite par l'IL-27. Malgré une variabilité considérable entre ces études, la majorité a observé l'implication des lymphocytes T CD8⁺ dans le rejet de la tumeur induit par l'IL-27. Cette dernière entraîne une augmentation de leur activité cytotoxique. Cependant, il semble que l'IL-27 exerce également des activités anti-tumorales indépendantes des cellules immunitaires. En effet, une étude de l'effet de l'IL-27 sur la croissance tumorale a été réalisée dans des souris NOD-scid. Ces souris n'ont pas de lymphocytes mais présentent également des défauts dans le développement des cellules myéloïdes, la fonction des cellules présentatrices de l'antigène et au niveau du complément. Les auteurs ont ainsi montré des résultats suggérant que l'IL-27 aurait des propriétés anti-angiogéniques supprimant ainsi la néovascularisation des tumeurs.

L'ensemble de ces données démontre donc l'intérêt de considérer l'IL-27 comme agent anti-cancéreux. Cependant, même si toutes les études réalisées *in vivo* chez la souris sont prometteuses, aucune administration systémique d'IL-27 chez un patient n'a été réalisée. Connaissant les effets secondaires sévères de l'IL-12 conduisant à une importante toxicité, il est probable que l'IL-27 induise également des effets secondaires. Cependant, l'IL-27 devrait être mieux tolérée que l'IL-12. En effet, une étude comparative de ces deux cytokines chez des souris, par administration systémique, a démontré que l'IL-27 induit une splénomégalie et une toxicité hépatique moins importantes que l'IL-12.

2.2.2. L'OSM

L'OSM a d'abord été identifiée pour sa capacité à inhiber la prolifération de certaines lignées tumorales, en particulier des mélanomes, des carcinomes de poumons, des neuroblastomes et des glioblastomes (162, 166, 303). L'inhibition de la prolifération, observée en réponse à l'OSM, se traduit par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, et par conséquent, une diminution du nombre de cellules en phase S. Cet arrêt du cycle cellulaire est caractérisé par l'induction des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 ou p27 (304, 305) ou de protéines, telles que « CCAAT/enhancer binding protein » (C/EBP) δ , qui répriment la transcription et induisent un arrêt cellulaire en phase G0/G1 (306, 307). Une étude démontre que l'OSM inhibe la prolifération de cultures primaires de glioblastomes mais n'exerce aucun effet sur leur pouvoir invasif ou sur la prolifération d'astrocytes normaux (308). De plus, cette cytokine induit une différenciation morphologique des glioblastomes, qui se traduit par un allongement des cellules et l'apparition de pseudopodes (Figure 27) (309).

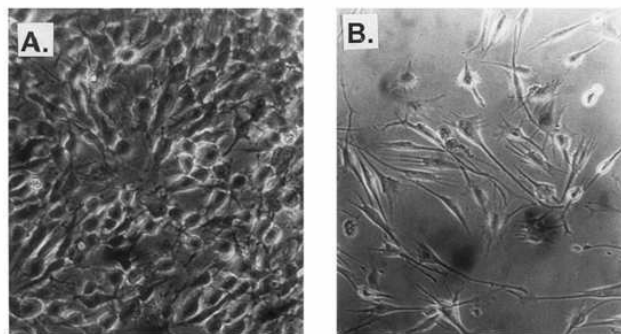


Figure 27 : Traitement de cellules humaines dérivées de gliomes avec de l'OSM.

(D'après Halfter et al., 1999, Mol.Cell Res.Commun.)

L'OSM induit une modification morphologique des cellules de gliome GOS3. (A) Cellules non traitées et (B) traitées avec 25 ng/ml d'OSM pendant 6 jours.

En outre, l'OSM semble moduler l'expression des « matrix metalloproteinases » (MMPs) et de leurs inhibiteurs : les « tissue inhibitors of MMPs » (TIMPs). Cette balance MMPs/TIMPs est impliquée dans la croissance de la tumeur, l'invasion et le développement de métastases (170). Néanmoins, l'OSM augmente également la sécrétion de « vascular endothelial growth factor » (VEGF) par des lignées d'astrogliomes (310). Le VEGF est un facteur essentiel pour l'angiogénèse puisqu'il permet le recrutement et la prolifération des cellules endothéliales vasculaires (170). La production de VEGF est augmentée dans les gliomes et ce taux est corrélé avec le grade de la tumeur. La concentration d'OSM est généralement élevée dans les cancers, y compris dans les glioblastomes, et par conséquent l'OSM pourrait ainsi favoriser l'angiogénèse en induisant le VEGF. Cet effet pro-angiogénique de l'OSM a été démontré *in vitro*, par l'induction de la prolifération de cellules endothéliales et la formation de capillaires, et *in vivo* dans un modèle de néovascularisation au niveau de la cornée chez le lapin (311). Cependant, une étude a démontré les effets anti-tumorigéniques de l'OSM *in vivo* sur des gliomes (312). Le modèle utilisé consiste à planter des cellules de gliome, transfectées avec l'OSM sous le contrôle d'un promoteur inducible, dans le cerveau de souris Nude. En absence d'expression de l'OSM, les souris développent des tumeurs de taille importante. A l'inverse, aucune tumeur n'a été observée dans les souris où l'expression de l'OSM a été induite.

L'OSM est également capable d'inhiber la prolifération de mélanomes (162). Une étude démontre qu'il induit, dans des mélanomes, l'expression de la molécule d'adhérence «intracellular adhesion molecule» 1 (ICAM-1) (313). Cette protéine est impliquée dans de nombreuses réponses immunitaires et dans le développement de métastases dans différents types de cancer (314, 315). En effet, il existe deux formes de cette protéine : une forme soluble et une forme membranaire. La forme membranaire permet une interaction des cellules tumorales avec les leucocytes et favorise ainsi la destruction de ces cellules par les lymphocytes T cytotoxiques. A l'inverse, la forme soluble empêcherait cette reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire et induirait ainsi leur progression et le développement de métastases. L'OSM augmente l'expression de la forme membranaire, favorisant ainsi la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire. Une étude démontre que l'OSM induit l'expression d'une intégrine, « alpha v beta integrin », modulant ainsi la capacité des cellules tumorales à adhérer à la matrice extracellulaire (316). Dans le cas de mélanomes, une diminution ou une perte d'activité inhibitrice de l'OSM ont été observées lors de la progression de la maladie (317). Une étude sur différentes lignées de mélanomes

métastatiques a permis de mettre en évidence une perte d'expression de la chaîne OSMR β , dans certaines lignées, à l'origine de la résistance à l'OSM (318).

L'ajout d'OSM sur des lignées de cancer du sein entraîne une différenciation morphologique avec un allongement des cellules et l'apparition de pseudopodes de manière similaire aux glioblastomes (319, 320). Ces modifications morphologiques sont caractérisées par une diminution de l'adhésion des cellules entre elles. L'OSM inhibe également la prolifération de cellules épithéliales mammaires normales. Cet effet de l'OSM est médié par son récepteur de type II (165). Néanmoins, l'OSM semble avoir un rôle dans le développement de métastases. En effet, des études démontrent que l'OSM inhibe l'adhérence de cellules de lignées tumorales mammaires et augmentent leur pouvoir invasif *in vitro* (321, 322). De plus, l'OSM induit l'expression de la cyclooxygénase-2, protéine impliquée dans le développement de cancer du sein et de métastases. L'OSM est produit par les neutrophiles et les macrophages associés aux tumeurs, cellules décrites pour favoriser le développement de métastases et la croissance tumorale.

L'OSM favorise également la prolifération des cellules de sarcome de Kaposi (KS) de patients infectés par le VIH (323, 324). L'OSM, ainsi que son récepteur de type II, sont exprimés par les cellules de KS et des anticorps neutralisant l'OSM entraînent une inhibition de la prolifération de ces cellules (325). L'OSM semble donc exercer un rôle dans l'apparition et la progression de la maladie ainsi que dans le maintien du phénotype transformé de ces cellules.

L'OSM peut donc agir sur la prolifération et la différenciation de nombreuses cellules, or il existe une forte interaction entre ces deux phénomènes et l'apoptose. Ainsi, les effets de l'OSM sur l'apoptose ont été étudiés par différents groupes et les résultats sont contradictoires selon les modèles utilisés. En effet, des études démontrent que l'OSM peut favoriser l'apoptose de cellules tumorales telles que la lignée Y-1 dérivée d'une tumeur adrénocorticale ou la lignée OSRGA dérivée d'ostéosarcomes (326, 327). A l'inverse, l'OSM semble protéger de l'apoptose certaines cellules comme par exemple la lignée MG63, dérivée d'ostéosarcome, en préservant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (328). Cependant, même si l'OSM peut agir sur l'apoptose dans certains cas, il peut également inhiber ou activer la prolifération des cellules indépendamment du processus d'apoptose.

L'ensemble de ces données démontre une implication de l'OSM dans le cancer. Cependant, les résultats sont encore trop contradictoires pour le considérer comme une nouvelle cible potentielle dans le développement de thérapies anti-tumorales. En effet, son activité cytostatique est clairement démontré mais l'OSM semble également jouer un rôle

dans l'angiogénèse et le développement de métastases. Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de préciser son rôle exact dans le cancer et surtout selon les différents types de cancer. L'étude des voies de signalisation cellulaire pourraient apporter des réponses en permettant de discriminer et ainsi de prédire les activités de l'OSM selon les voies activées. En effet, de nombreuses études ont déjà montré l'importance des voies de signalisation dans le cancer.

2.3. Implication des voies de signalisation cellulaire : STAT3, une cible pour le développement de traitements anti-cancéreux

La voie JAK/STAT est la voie activée par les cytokines de la famille de l'IL-6 la plus décrite dans le cancer et en particulier les protéines STATs. L'activation constitutive de plusieurs STATs a été observée dans de nombreuses lignées cellulaires et dans des tumeurs primaires, comprenant les cancers des tissus hématopoïétiques et des tumeurs solides (329).

Une activation constitutive de STAT3 ou de STAT5 exerce des propriétés transformantes et est fortement associée à la progression et au développement du cancer. De nombreuses études suggèrent que les STATs pourraient participer à l'oncogénèse en induisant une surexpression de protéines inhibitrices de l'apoptose, régulatrices du cycle cellulaire et inductrices de l'angiogénèse.

Type de tumeur	STATs activés
<i>Cancer du sein</i>	STAT 1,3
<i>Cancer de la tête et du cou</i>	STAT 1,3
<i>Mélanomes</i>	STAT 1,3
<i>Cancer du cerveau</i>	STAT 1,3, 5
<i>Myélome multiple</i>	STAT 1,3
<i>Lymphomes</i>	STAT 3,5
<i>Leucémies</i>	STAT 1,3, 5
<i>Cancer de la prostate</i>	STAT 3
<i>Carcinome rénal</i>	STAT 3
<i>Adénocarcinome pancréatique</i>	STAT 3
<i>Carcinome ovarien</i>	STAT 3

Tableau 4 : Activation des STATs dans les cellules tumorales humaines.

(D'après Turkson, J et al., Oncogene, 2000)

Le tableau ci-dessus répertorie l'activation des STATs observée dans des tumeurs primaires ou dans des lignées tumorales, et met ainsi en évidence le rôle important de STAT3 et de STAT1 dans le cancer.

STAT3 est constitutivement activé dans de nombreuses tumeurs solides et dans des lignées transfectées avec des oncoprotéines, telles que v-Abl et v-SRC, ou infectées par différents virus inducteurs de tumeurs. Aucune mutation de STAT3, induisant son activation constitutive, n'a été observée chez un patient jusqu'à aujourd'hui. Néanmoins, un mutant de STAT3, qui ne requière pas de phosphorylation sur les tyrosines pour être activé, est capable de migrer dans le noyau, d'activer la transcription et d'induire la transformation des cellules conduisant ainsi à la formation de tumeurs dans des souris Nude : STAT3 exerce donc un véritable rôle de protooncogène. En effet, son activation est parfois même indispensable à la croissance et à la survie de plusieurs cellules tumorales humaines telles que les myélomes multiples ou les carcinomes mammaires.

STAT3 induit la transcription de gènes cibles impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Il favorise la prolifération cellulaire en induisant l'expression de protéines telles que les cyclines D1/D3 et c-Myc, ou en réprimant l'expression de protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que p21 et p27. Il induit également l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl telles que Bcl-xL, Bcl-2 ou Mcl-1. De plus, STAT3 semble être impliqué dans l'angiogénèse tumorale en induisant l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF. Il contribue également à la migration et à l'invasion tumorales en régulant l'expression de métalloprotéinases (MMPs) telles que MMP-2 et MMP-9 (330).

A l'inverse STAT1 peut être considéré comme suppresseur de tumeurs car son activation est associée à un arrêt de la croissance cellulaire. De plus, la dérégulation de l'activité des STATs, au niveau du système immunitaire, doit contribuer au développement tumoral en induisant une perte de la surveillance immunitaire. En conclusion, l'implication évidente des STATs, et en particulier de STAT3, dans l'oncogénèse ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de thérapies anti-cancéreuses.

3. Les thérapies anti-cytokines développées contre les membres de la famille de l'IL-6

Depuis la découverte des cytokines et de leur implication dans des pathologies, un nombre croissant d'études consiste à découvrir ou à générer des antagonistes de ces cytokines. Cet enthousiasme est justifié par la sélectivité d'action de ces antagonistes permettant ainsi

d'agir à un stade précis de la réponse immunitaire. On peut ainsi espérer un effet thérapeutique maximal de ces molécules avec des effets secondaires réduits, ce qui les opposerait ainsi aux drogues utilisées comme les corticostéroïdes, dont le spectre d'action plus étendu est à l'origine de nombreux effets secondaires.

3.1. Les anticorps : exemple du traitement de la polyarthrite rhumatoïde par un anticorps anti-IL-6R α

La plupart des protéines générées afin d'inhiber les cytokines sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les cytokines ou leurs récepteurs. Ce type d'antagoniste présente certains avantages tels qu'une grande spécificité. Néanmoins, ces protéines présentent également des inconvénients liés à leur nature protéique. En effet, ces anticorps, initialement d'origine murine, sont reconnus en tant que protéines étrangères par le système immunitaire, et induisent ainsi une immunisation à l'origine d'une perte d'efficacité. Afin de contourner cet effet délétère, une humanisation de ces anticorps est réalisée mais les résultats restent partiels. Malgré cet inconvénient, l'efficacité de plusieurs anticorps -dont certains dirigés contre l'IL-6 ou son récepteur- a pu être démontrée lors d'essais cliniques.

Une dérégulation de la production d'IL-6 exerce des rôles pathologiques dans des maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Castelman, l'arthrite idiopathique juvénile et la maladie de Crohn (331). Ces maladies sont souvent réfractaires aux thérapies conventionnelles comme les corticostéroïdes ou les agents immunosuppresseurs. Des traitements anti-TNF- α ont alors été testés dans certaines de ces maladies et se sont révélés efficaces. Cependant, certains patients ne répondent pas à ces traitements et présentent un risque élevé pour des maladies infectieuses sévères. Il y a donc une nécessité de développer de nouveaux traitements pour ces maladies réfractaires et l'IL-6 représente une cible potentielle.

Un anticorps anti-IL-6R α humanisé a été généré en associant les régions variables d'un anticorps de souris, dirigé contre l'IL-6R α , à la région constante IgG1 humaine. Cet anticorps, appelé Tocilizumab, est ainsi moins immunogénique chez l'homme et présente une demie-vie plus longue *in vivo*. Il est capable d'inhiber les formes membranaire et soluble de l'IL-6R α .

La polyarthrite rhumatoïde (PAR) est la maladie autoimmune la plus fréquemment observée. Elle est caractérisée par une hyperplasie synoviale, une destruction osseuse ainsi que du cartilage au niveau des articulations atteintes. Une surproduction d'IL-6 semble jouer

un rôle crucial dans le développement de cette pathologie. En effet, un taux élevé d'IL-6 est observé dans le liquide synovial et le sérum de patients atteints de PAR. De plus, ce taux est corrélé avec la sévérité de la maladie. L'IL-6 exercerait un rôle dans l'inflammation mais également dans l'ostéoporose. Après des résultats prometteurs chez la souris et chez le singe, dans des modèles d'arthrite induite par le collagène, des essais cliniques ont été réalisés chez des patients atteints de PAR. Ce traitement, testé en phases I et II, s'est révélé efficace. Des études cliniques en phase III sont en cours de réalisation. De même des études cliniques, utilisant l'anticorps anti-IL-6R α , sont en cours pour le traitement de patients atteints de la maladie de Castleman, de la maladie de Crohn, d'arthrite idiopathique juvénile, de lupus ou de myélome multiple.

3.2. Les formes solubles des récepteurs

Afin de réguler l'activité des cytokines, les cellules développent leurs propres antagonistes. Il existe ainsi dans la circulation des récepteurs solubles de cytokines, dont la plupart exerce une activité antagoniste en se fixant à la cytokine, bloquant ainsi son interaction avec le récepteur membranaire correspondant.

3.2.1. Agonistes ou antagonistes « naturels » ?

Trois mécanismes sont responsables de la génération de récepteurs solubles de cytokines. Il peut s'agir du clivage d'une liaison GPI grâce à l'action de la phospholipase C, comme cela a été décrit pour le CNTFR α (110, 112), de la protéolyse limitée d'un récepteur membranaire ou de l'épissage alternatif d'un ARNm comme cela a été démontré pour l'IL-6R α (332-334). Certains récepteurs solubles sont détectés dans le sérum ou l'urine de sujets sains. L'IL-6R α soluble (IL-6Rs) est détecté à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans l'urine et dans le sérum d'individus sains (335, 336). Son taux est augmenté dans certaines pathologies telles que le myélome multiple au stade terminal ou lors d'infections par le VIH (336, 337). De même, la concentration de CNTFRs est plus élevée dans l'urine de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (SLA) comparée à des sujets sains (338). Une augmentation de LIFRs a également été observée dans le sérum de souris gestantes et chez des femmes au cours de la grossesse (339, 340). Ces différentes chaînes réceptrices solubles, présentes au niveau sérique, pourraient ainsi être des marqueurs biologiques de pathologies.

Ces récepteurs solubles exercent des activités importantes. Ils peuvent être associés à des ligands afin de former des cytokines composites comme nous l'avons vu précédemment. Ils peuvent également moduler l'activité des cytokines. En effet, selon leur nature, ils peuvent exercer des activités agonistes ou au contraire antagonistes vis-à-vis de la cytokine. Les formes solubles des chaînes réceptrices α qui sont peu ou pas impliquées dans la signalisation cellulaire, telles que l'IL-6R α ou le CNTFR α , sont douées d'activité agoniste. Ainsi, le CNTF est capable, en présence de CNTFR α soluble, d'initier la transduction du signal intracellulaire par l'intermédiaire de l'hétérodimère gp130/LIFR (112). De même, la forme soluble de l'IL-6R α exerce une activité agoniste comme nous l'avons vu dans le chapitre I. Elle est capable d'induire une réponse biologique, en combinaison avec l'IL-6, dans des cellules n'exprimant pas la forme membranaire de l'IL-6R α . Ce phénomène de « transsignalisation » confère ainsi à des cellules dépourvues d'IL-6R α la capacité de répondre à l'IL-6. Cependant, comme cela a été démontré pour l'IL-6Rs ou une forme recombinante de l'IL-11R α soluble, ces chaînes α peuvent également agir comme antagonistes selon l'environnement ou en combinaison avec d'autres chaînes solubles (341). En effet, les formes solubles des chaînes de transduction, telles que gp130 ou LIFR, exercent des activités antagonistes. Des études réalisées avec les formes solubles de l'IL-6R α et de gp130 ont montré que l'IL-6 fixe l'IL-6Rs et gp130s afin de former un hexamère neutralisant l'IL-6 (342, 343). Les formes solubles, de gp130 et de LIFR, semblent être préférentiellement générées par épissage alternatif de l'ARNm, même si leur génération par protéolyse limitée a également été démontrée (334, 344). De même que pour gp130, une activité antagoniste d'une forme soluble du LIFR a été mise en évidence (339). Ainsi, l'existence de ces formes solubles a permis l'émergence d'une nouvelle génération d'antagonistes chimériques.

3.2.2. Une nouvelle génération d'antagonistes de cytokines : les « cytokine-traps »

Les récepteurs des cytokines étant dimériques pour la plupart, l'idée est de générer des molécules chimériques mimant l'organisation structurale des équivalents membranaires. Ces constructions peuvent ainsi agir comme des compétiteurs, pour les récepteurs membranaires, spécifiques et affins pour les cytokines. La première stratégie décrite consiste à lier deux chaînes réceptrices solubles par un fragment constant d'immunoglobulines. Ces protéines de fusion se dimérisent naturellement grâce à des ponts disulfures entre les domaines Fc (Figure 28).

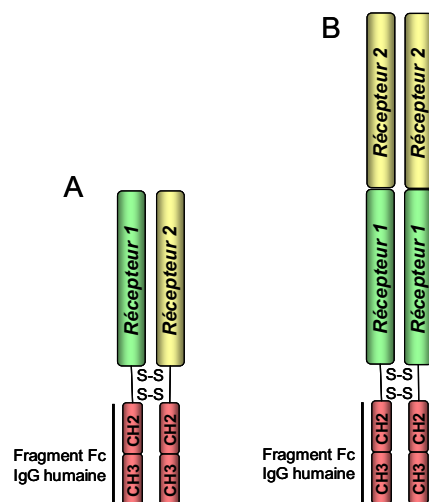


Figure 28 : Représentations schématiques des cytokine-traps

(D'après Economides *et al.*, Nature Medecine, 2002).

A. Structure d'un antagoniste hétérodimérique. B. Structure d'un antagoniste linéaire.

Il existe deux stratégies afin de générer ces antagonistes appelés « cytokine-traps ». Une première consiste à fusionner, de manière indépendante, les domaines extracellulaires de deux chaînes réceptrices différentes au fragment Fc d'une immunoglobuline IgG1 humaine. Une seconde consiste à disposer les domaines extracellulaires de deux chaînes réceptrices différentes de manière linéaire, puis à les associer au fragment Fc d'une immunoglobuline IgG1 humaine.

L'intérêt de ces molécules chimériques, par rapport aux récepteurs solubles isolés, est double : d'une part, l'utilisation d'un fragment constant d'immunoglobuline permet d'accroître la durée de vie de la molécule ; d'autre part, le caractère dimérique de cet antagoniste potentialise son effet neutralisant. Cette méthode a d'abord été utilisée afin d'inhiber le TNF- α puis elle a été étendue à d'autres cytokines comme l'IL-1, l'IL-4 ou l'IL-6 (345-347). Contrairement au TNF- α , ces dernières protéines se fixent sur des récepteurs hétérodimériques et non homodimériques. Afin d'inhiber ces cytokines de façon efficace, les protéines de fusion doivent donc être constituées des différentes chaînes réceptrices. Leur efficacité a pu être démontrée *in vitro* mais également *in vivo*, et des études cliniques en phase II sont en cours pour l'IL-1-trap dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, l'affinité de ces protéines pour les cytokines correspondantes est excellente et peut même être supérieure à celle des récepteurs membranaires et des anticorps. De plus, l'autre avantage de cette technique, comparée à l'utilisation d'anticorps, est la nature de ces protéines de fusion car elles sont entièrement constituées de fragments protéiques humains. Par conséquent, elles n'entraînent pas de réponse immunitaire. Plus récemment, une protéine de fusion a été

générée sur le même modèle afin d'inhiber l'IL-27 et elle s'est révélée efficace *in vivo* chez la souris dans le traitement de la septicémie (348).

Une modification a été apportée afin de générer des antagonistes de l'IL-6 et du LIF (349, 350). Cette modification est la présence d'un peptide de liaison, évitant la dimérisation par l'intermédiaire du fragment Fc et par conséquent facilitant ainsi la purification. De plus, ce peptide de liaison confère à la protéine une plus grande flexibilité lui permettant ainsi d'adopter une conformation optimale afin de fixer la cytokine. Ces études ont également permis de définir précisément les domaines des chaînes réceptrices essentiels à la fixation de la cytokine. Ainsi, ces constructions, tout en étant minimalistes, ont une affinité maximale pour la cytokine.

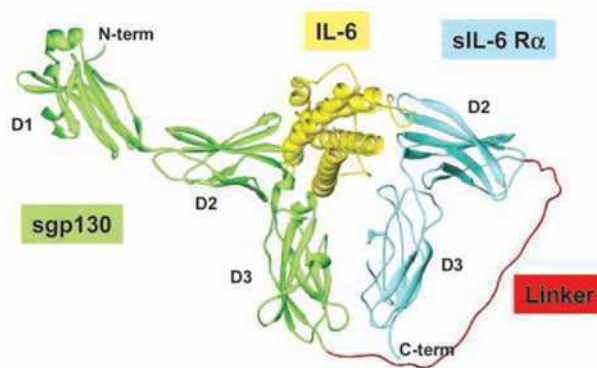


Figure 29 : Modèle structuraux de l'IL-6 et de son antagoniste

(D'après Ancey *et al.*, J.Biol.Chem., 2003)

Cette nouvelle génération d'antagonistes présente de nombreux avantages et offre ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement de pathologies associées aux cytokines, telles que des maladies inflammatoires ou des cancers.

OBJECTIFS

Les axes de recherche du laboratoire s'articulent autour des cytokines de la famille de l'IL-6. Dans la continuité de la thématique du laboratoire, nous avons identifié un nouveau récepteur apparenté à gp130, la chaîne commune aux récepteurs des cytokines de cette famille. Ce récepteur, que nous avons appelé « gp130-like protein » (GPL), était orphelin jusqu'à l'identification de son ligand par Zymogenetics. Il s'agit de l'interleukine-31, cytokine apparentée aux membres de la famille de l'IL-6 de par sa structure et son récepteur. En effet, elle présente une structure en quatre hélices α et son récepteur hétérodimérique est constitué de GPL mais également d'OSMR β , chaîne partagée avec l'OSM. Nous avons ainsi cloné et étudié au laboratoire cette cytokine, et au commencement de ma thèse aucun article ne portait sur l'IL-31. Cependant, nous connaissions déjà l'implication de cette cytokine dans une pathologie cutanée : la dermatite atopique. En collaboration avec l'équipe EA 3806 de Poitiers, nous avons étudié les activités biologiques de l'IL-31 mais également de l'OSM sur les kératinocytes. Nous avons ainsi démontré une implication de l'OSM dans une autre pathologie cutanée : le psoriasis. Le premier axe de recherche de ma thèse consistait à générer des antagonistes de ces deux cytokines qui représentent des cibles potentielles pour le traitement de ces maladies. Il existe différentes stratégies afin d'inhiber les cytokines et nous avons choisi une stratégie consistant à générer des récepteurs solubles afin de piéger les cytokines. J'ai ainsi construit des antagonistes que j'ai validé *in vitro* dans différents tests biologiques. Ces cytokines présentent une spécificité d'espèce, j'ai donc généré les antagonistes humains mais également leurs homologues murins. En effet, il était nécessaire de générer ces protéines murines afin de réaliser des études *in vivo* de ces antagonistes dans des modèles de pathologies chez la souris.

En parallèle à l'étude fonctionnelle de ces antagonistes, un deuxième axe de recherche de ma thèse consistait à cloner et à étudier les activités biologiques de l'IL-31 de rat. En effet, seules l'IL-31 humaine et murine avaient été clonées au début de ma thèse. A l'aide de données bioinformatiques, nous avons identifié la séquence de l'IL-31 chez le rat. Nous l'avons ainsi cloné et produite au laboratoire. Nous avons ensuite réalisé différents tests biologiques afin de mettre en évidence la fonctionnalité de notre protéine. De façon similaire à ses homologues humain et murin, l'IL-31 de rat semble présenter un tropisme cutané.

L'IL-31 est une cytokine très récemment identifiée et par conséquent, un troisième axe de recherche de ma thèse consistait à étudier cette cytokine et à mettre en évidence de nouvelles activités biologiques. Connaissant les propriétés cytostatiques de l'OSM et étant donné que ces deux cytokines partagent une chaîne réceptrice, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-31 pouvait également exercer des propriétés cytostatiques. Nous avons ainsi mis en

OBJECTIFS

évidence cette nouvelle activité biologique de l'IL-31. De plus, nous avons également étudié les voies de signalisation activées par l'IL-31 et l'OSM, dans les lignées tumorales dont elles inhibent la prolifération, afin de mettre en évidence la voie de signalisation majoritairement impliquée dans ces effets cytostatiques.

RESULTATS

Article 1

Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M/interleukin-31 shared receptor.

Diveu C., Venereau E., Froger J., Ravon E., Grimaud L., Rousseau F., Chevalier S., Gascan H.

J Biol Chem. 2006 Dec 1;281(48):36673-82.

1. Récepteurs solubles de cytokines

Contrairement aux cytokines de la famille de l'IL-6, l'OSM a pour particularité de se fixer à deux types de récepteurs. Le récepteur de type I, constitué de l'hétérodimère gp130/LIFR β , est partagé avec le LIF. A l'inverse, le récepteur de type II, constitué de gp130 et de l'OSMR β , est spécifique de l'OSM. Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux récepteurs membranaires existent également sous forme soluble. Ces formes solubles sont, pour la plupart, générées par deux mécanismes : la protéolyse limitée du récepteur membranaire et/ou l'épissage alternatif de l'ARN codant pour le récepteur membranaire. Selon leur nature et le contexte environnemental, elles peuvent exercer des activités opposées. En ce qui concerne les chaînes α solubles, il s'agit souvent d'un effet agoniste tandis que les chaînes β solubles exercent à l'inverse un effet antagoniste. Des formes solubles de gp130, du LIFR β , de l'IL-6R α et du CNTFR α ont ainsi été décrites. De manière similaire, nous avons alors cherché à identifier une forme soluble de la chaîne de transduction OSMR β .

2. Identification et activités biologiques de l'OSMR β soluble (OSMRs)

Afin d'identifier une forme soluble de l'OSMR β , nous avons mis au point un ELISA en combinant deux à deux les 18 anticorps monoclonaux générés au laboratoire contre la partie extracellulaire de l'OSMR β . Cet ELISA permet la détection d'une protéine chimérique, appelée OSMR-Fc, constituée de la partie extracellulaire de l'OSMR β associée à la région constante de l'IgG1 (figure 1). Cet ELISA mis en place nous a permis de doser l'OSMRs dans des surnageants de culture de lignées cellulaires et nous avons ainsi montré que ce récepteur soluble est sécrété par des lignées de glioblastomes, d'hépatomes et une lignée de mélanome

(figure 2). Nous avons également détecté l'OSMRs dans le sérum de sujets sains et son taux est fortement augmenté dans le sérum de patients atteints de myélome multiple (figure 3). Connaissant l'implication de l'OSM dans la prolifération de lignées cellulaires de myélome multiple, on peut émettre l'hypothèse que l'OSMRs pourrait, en coopération avec gp130s, protéger la cytokine de la dégradation, comme cela a été suggéré pour l'IL-6 complexé avec IL-6Rs et gp130s.

Connaissant les mécanismes de génération des récepteurs solubles des cytokines de la famille de l'IL-6, nous avons recherché une forme soluble de l'OSMR β naturelle générée par épissage alternatif. Nous avons ainsi amplifié par PCR, à partir de la lignée d'hépatome WRL68, un ADNc codant pour une forme épissée de l'OSMR β . Le phénomène d'épissage alternatif prend place au niveau de l'intron 7, où la phase de lecture ouverte de l'exon 7 se poursuit alors dans l'intron 7 jusqu'à un codon stop (figure 4B). Cet ADNc de 1185 pb code pour une protéine de 394 acides aminés dont la séquence de la partie extracellulaire est identique à celle de l'OSMR β membranaire excepté dans sa partie C-terminale. Cette dernière se différencie par l'addition de 16 acides aminés codés par l'intron 7 (figure 4C). Au niveau structural, l'OSMRs comprend un peptide signal, suivi d'un CBD tronqué, contenant le motif WSXWS, puis d'un domaine de type « Ig like », et enfin d'un autre CBD tronqué, contenant les quatre cystéines en positions conservées (figure 4B). Afin d'étudier ses activités biologiques, nous avons ensuite cloné, produit et purifié cette protéine (figure 6). L'interaction de l'OSMRs avec son ligand, l'OSM, a été mise en évidence par des expériences de co-immunoprécipitation (figure 7). Nous avons ensuite démontré dans des tests de signalisation cellulaire que l'OSMRs exerce, en présence des formes solubles de gp130 ou de GPL, une activité antagoniste vis-à-vis de l'OSM ou de l'IL-31 respectivement (figure 8A et C). Cette inhibition de l'OSM induite par l'OSMRs et gp130s a été confirmée dans des tests de prolifération cellulaire (Figure 9C et D). Enfin, nous avons observé une augmentation de la production de l'OSMRs induite par l'OSM dans des lignées tumorales (figure 10).

L'OSM exerce un effet cytostatique sur les tumeurs gliales. Ainsi, l'OSMR soluble produit par ces mêmes tumeurs, pourrait piéger l'OSM afin de protéger la tumeur de ses effets anti-prolifératifs.

3. Génération et analyse fonctionnelle d'un antagoniste de l'OSM

Comme d'autres membres de la famille de l'IL-6, l'OSM est impliquée dans des réponses inflammatoires sévères notamment au niveau du foie. Différentes stratégies ont été utilisées afin d'inhiber ces cytokines et ainsi d'apporter de nouvelles perspectives concernant le traitement de pathologies inflammatoires. Une première consiste à utiliser des anticorps et une seconde consiste à générer des récepteurs solubles de ces cytokines. Cette dernière représente une nouvelle génération d'antagonistes basée sur l'association des domaines extracellulaires de différentes chaînes réceptrices. Les expériences réalisées avec l'OSMRs ont mis en évidence son activité antagoniste mais uniquement en présence de gp130s. Les deux chaînes réceptrices sont donc essentielles afin de piéger la cytokine avec efficacité. Nous avons ainsi choisi de générer un antagoniste de l'OSM en nous basant sur l'utilisation de récepteurs solubles et plus particulièrement sur le modèle de l'antagoniste de l'IL-6 généré par l'équipe de Peter C. Heinrich (349).

Afin d'inhiber spécifiquement l'OSM sans réactivité croisée avec le LIF, l'antagoniste a été généré à partir du récepteur de type II. Il est constitué des domaines extracellulaires essentiels à la fixation de la cytokine c'est-à-dire les domaines CBD et « Ig-like » de l'OSMR β d'une part et de gp130 d'autre part. Pour des raisons conformationnelles, nous avons choisi de placer l'OSMR β avant gp130. En effet, il est préférable de mettre le composant de plus grande taille à l'extrémité N-terminale pour des raisons d'encombrement stérique. Nous avons associé les domaines des différentes chaînes réceptrices à l'aide d'un peptide de liaison déjà décrit dans la construction de l'antagoniste de l'IL-6. Ce peptide de liaison correspond à la courte partie extracellulaire proximale à la région transmembranaire de l'IL-6R α . Il est constitué d'acides aminés de petite taille ce qui confère à la protéine de fusion une plus grande flexibilité et lui permet ainsi d'adopter une conformation optimale afin de fixer la cytokine. De plus, il ne pose pas de problème d'immunogénicité car il s'agit d'un fragment protéique existant naturellement.

Nous avons cloné la séquence codant pour l'antagoniste dans un vecteur d'expression puis nous l'avons produit en système eucaryote en transfectant des cellules HEK 293. La protéine, purifiée par affinité, a été testée pour son activité antagoniste. Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests de signalisation cellulaire (Figure 8B). L'antagoniste est capable d'inhiber la phosphorylation de STAT3 en réponse à l'OSM. A l'inverse, il n'a aucun effet sur la phosphorylation induite par l'IL-6 ou le LIF : il est donc spécifique de l'OSM. En effet, l'IL-6 et le LIF ont été utilisés comme contrôles de spécificité car ces deux cytokines

interagissent également avec gp130. Il était donc nécessaire de vérifier si la partie de gp130, contenue dans la protéine de fusion, n'était pas suffisante pour inhiber ces cytokines. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des expériences de prolifération cellulaire en utilisant la lignée BA/F3 transfectée avec les chaînes du récepteur de type II de l'OSM (Figure 9E). Ainsi, l'OSM induit la prolifération de cette lignée mais l'antagoniste inhibe cette prolifération lorsqu'il est ajouté à la cytokine. De même, l'antagoniste inhibe la prolifération induite par l'OSM dans la lignée BA/F3 exprimant le récepteur de type I, mais il n'a aucun effet sur la prolifération induite par le LIF. Cette expérience confirme la spécificité de l'antagoniste pour l'OSM.

Cette étude met donc en évidence l'existence d'une forme soluble naturelle de l'OSMR sécrétée par différents types cellulaires. Cette dernière exerce des activités antagonistes vis-à-vis de l'OSM ou de l'IL-31, en combinaison avec les formes solubles de gp130 ou de GPL respectivement. Cette étude nous a conduit à générer un antagoniste permettant d'inhiber spécifiquement l'OSM. Cette protéine chimérique, constituée d'une partie des domaines extracellulaires de l'OSMR et de gp130, représente ainsi une nouvelle perspective thérapeutique afin de réduire l'inflammation associée à des pathologies chroniques.

Molecular and Functional Characterization of a Soluble Form of Oncostatin M/Interleukin-31 Shared Receptor^{*S}

Received for publication, July 24, 2006, and in revised form, August 31, 2006. Published, JBC Papers in Press, October 6, 2006, DOI 10.1074/jbc.M607005200

Caroline Diveu¹, Emilie Venereau, Josy Froger, Elisa Ravon, Linda Grimaud, François Rousseau, Sylvie Chevalier, and Hugues Gascan²

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U564, F-49033 Angers, France

Activation of the signaling transduction pathways mediated by oncostatin M (OSM) requires the binding of the cytokine to either type I OSM receptor (leukemia inhibitory factor receptor/gp130) or to type II OSM receptor (OSMR/gp130). In the present work we have developed an enzyme-linked immunosorbent assay detecting a soluble form of OSMR (sOSMR) secreted by glioblastoma, hepatoma, and melanoma tumor cell lines. sOSMR was also present in sera of healthy individuals, with increased levels in multiple myeloma. Molecular cloning of a corresponding cDNA was carried out, and it encoded for a 70-kDa protein consisting of a half cytokine binding domain containing the canonical WSXWS motif, an immunoglobulin-like domain, and the first half of a second cytokine binding domain with cysteines in fixed positions. Analysis of the soluble receptor distribution revealed a preferential expression in lung, liver, pancreas, and placenta. sOSMR was able to bind OSM and interleukin-31 when associated to soluble gp130 or soluble interleukin-31R, respectively, and to neutralize both cytokine properties. We have also shown that OSM could positively regulate the synthesis of its own soluble receptor in tumor cells.

Oncostatin M (OSM)³ was originally isolated from culture supernatant of U937 histiocytic leukemia cells based on its ability to inhibit the proliferation of the A375 melanoma cell line (1, 2). OSM is produced by activated monocyte, T lymphocyte, and dendritic cell types and is also described as a potent inducer of inflammation (3–8). OSM belongs to the interleukin-6 cytokine family also encompassing IL-11, IL-27, leukemia inhibi-

tory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1, cardiotrophin-like cytokine, and neuropoietin (9–12).

The cytokines of the IL-6 family use two- or three-membrane subunit receptors to form high affinity receptor complexes able to mediate downstream signaling events (13–14). These receptors belong to the type I cytokine receptors, characterized by the presence of at least one cytokine binding domain (CBD) with conserved cysteine positions and a WSXWS motif (15). All the receptor complexes belonging to the IL-6 cytokine family share the common gp130 signaling receptor subunit in the formation of their multimeric receptors (16). Depending on the ligand, gp130 can either homodimerize in the presence of IL-6 or IL-11 (17, 18) or heterodimerize with related type I cytokine receptors such as LIFR, IL-27R, or OSMR when recruited by other members of the IL-6 family of cytokines (19–21).

In humans, OSM signal transduction occurs via two distinct receptor complexes. The type I OSM receptor consists of the low affinity chain, LIFR, associated to gp130 (19). This type I receptor can indifferently bind LIF or OSM. Through this mechanism, OSM elicits biological activities overlapping with those induced by LIF, such as hepatocyte activation, bone renewal, or the *in vitro* maintenance of embryonic stem cell phenotype (22).

The type II OSM receptor, specifically recognizing OSM, associates gp130 and the OSMR subunit (23). OSMR is a 150-kDa protein composed in its external portion of a half CBD followed by an immunoglobulin-like domain, a second complete CBD, and then a region consisting of three FnIII domain repeats. The cytoplasmic domain of the receptor contains motifs required for the recruitment of Jak1, Jak2, and Tyk2 as well as of STAT1, STAT3, and STAT5 signaling pathways (24, 25).

The interaction of OSM with its specific type II receptor mediates the unique functions of OSM that cannot be mimicked by LIF or other IL-6 family members. Signaling by the type II OSM receptor inhibits the proliferation of a number of tumor cells, including glioblastoma, melanoma, mammary, and prostatic cell lines (1, 2, 26–28). In addition, OSM potently induces the proliferation of Kaposi sarcoma, fibroblastic, and smooth muscle cells (29–31). It was recently reported that OSMR could also be recruited by IL-31, a novel cytokine with a skin tropism (32–34).

Soluble cytokine receptors are involved in the regulation of a number of physiological and pathological situations. They can behave either as agonists or antagonists of cytokine signaling depending on the particular family of cytokines. Soluble cytokine receptors can be generated by different mechanisms,

* This study was supported in part by Grant 5176 from the Association pour la Recherche contre le Cancer and by the Post-Genome Program of the Région Pays de la Loire. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

^S The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S3.

¹ Supported by grants from Angers Agglomération and the Société Française d'Hématologie.

² To whom correspondence should be addressed: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U564, CHU d'Angers, 4 Rue Larrey, F-49033 Angers, France. Tel.: 33-2-41-35-47-31; Fax: 33-2-41-73-16-30; E-mail: gascan@univ-angers.fr.

³ The abbreviations used are: OSM, oncostatin M; OSMR, OSM receptor; sgp130, soluble gp130; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; mAb, monoclonal antibody; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GPL, gp130-like receptor; IL, interleukin; sIL, soluble IL; LIF, leukemia inhibitory factor; LIFR, LIF receptor; CNTF, ciliary neurotrophic factor; CBD, cytokine binding domain; STAT, signal transducer and activator of transcription.

Characterization and Function of a Soluble OSM Receptor

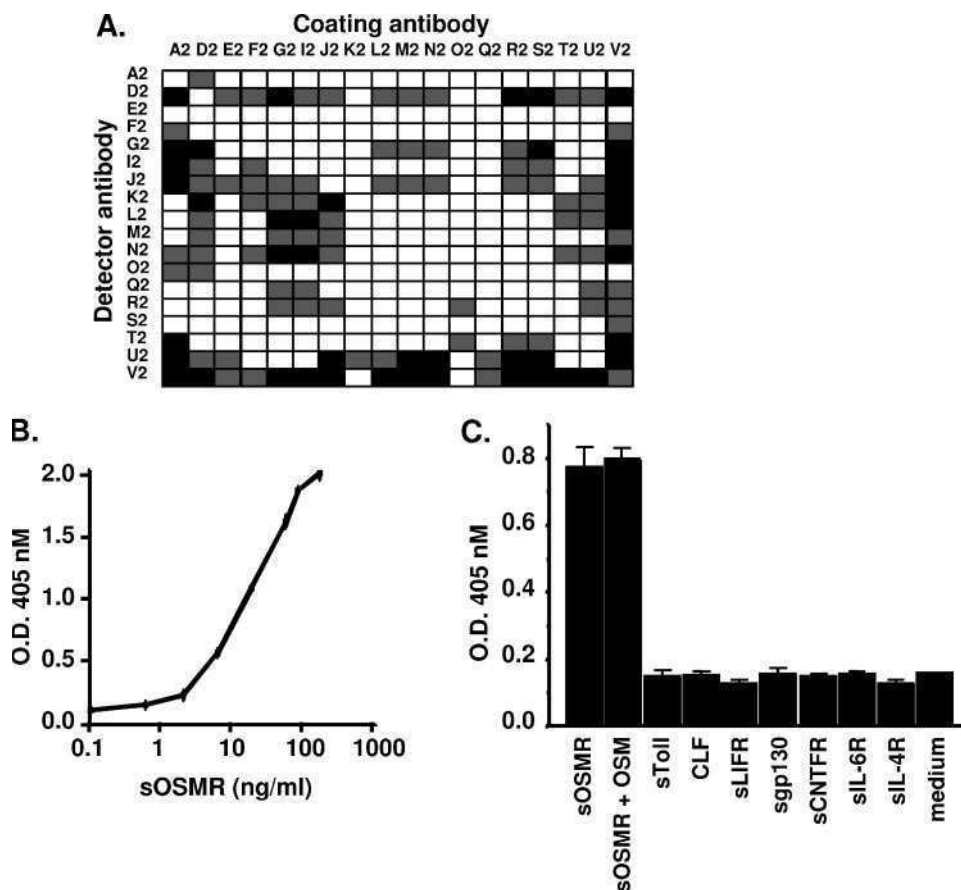


FIGURE 1. Development of a soluble OSMR ELISA. *A*, 18 anti-OSMR mAbs were tested either as capture antibody (10 μ g/ml) or as tracer antibody (1 μ g/ml) to detect soluble OSMR-Fc. In *black*, signal detected for a 10-ng/ml concentration of OSMR-Fc. In *gray*, signal detected for a 100-ng/ml concentration of OSMR-Fc. In *white*, absence of signal. *B*, ELISA standard curve obtained using the AN-A2 mAb as a capture antibody and the AN-V2 mAb as a tracer antibody. *C*, absence of cross-reactivity with related or distant cytokine receptors. *Drosophila* Toll-Fc, CLF-Fc, soluble LIFR, sgp130, soluble CNTFR, sIL-6R, sIL-4R, and OSM were added at 50 ng/ml.

including proteolytic cleavages of the receptor extracellular parts, alternative splicing of RNA transcripts, or cleavage of a glycosylphosphatidylinositol anchor (35).

The soluble counterparts of α -membrane chains, such as soluble IL-6 or CNTF receptors, are able to potentiate the functional responses to their respective ligands (36, 37). In contrast, β -chain-derived soluble receptors, such as soluble gp130, neutralize the response to IL-6, IL-11, or CNTF (38). In the present work we have molecularly and functionally characterized a soluble form of the OSM/IL-31 shared receptor.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Reagents—All the cell lines used in this study were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. BA/F3 gp130/OSMR and BA/F3 gp130/LIFR factor-dependent cell lines were grown in the same culture medium supplemented with OSM and LIF, respectively, as previously described (39). Human OSM, interferon γ , transforming growth factor β , IL-1 α , IL-2, IL-10, IL-11, CT-1, soluble CNTF receptor, soluble gp130 (sgp130), soluble LIF receptor, soluble IL-6 receptor (sIL-6R), soluble IL-4 receptor (sIL-4R) were purchased from R&D Systems. *Drosophila* Toll-Fc, human CLF-Fc, GPL/IL-31R-Fc, and IL-31 were made in the laboratory as previ-

ously described (11, 34, 40). Antibody raised against phospho-STAT3 was bought from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-STAT3 antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-V5 antibody coupled to peroxidase was purchased from Invitrogen. Goat anti-mouse and anti-rabbit peroxidase-labeled immunoglobulins were from Clinisciences (Montrouge, France). Monoclonal antibodies against gp130 (AN-G73, AN-G40) were produced in the laboratory. Anti-OSMR antibodies (described in Fig. 1) were obtained following the conventional protocols after immunization of the mice with a soluble form of OSMR and by fusing the splenocytes with the SP2/o myeloma.

Serum Samples—Sera from healthy humans were obtained from informed volunteers, and the sera of multiple myeloma-suffering patients were obtained from people who gave their informed consent in agreement with French legislation.

ELISA Detection—For the detection of the soluble forms of OSMR and gp130, the AN-A2 (anti-OSMR) or AN-G73 (anti-gp130) mAbs were coated at a concentration of 10 μ g/ml in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6. After washes and a Tris 0.1 M sucrose 20% saturation

step, the samples were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C. The detection was performed using 1 μ g/ml AN-V2 (anti-OSMR) or AN-G40 (anti-gp130) biotinylated mAbs in phosphate-buffered saline, bovine serum albumin, 0.1% Tween 0.01% followed by a streptavidin peroxidase step. Visualization was performed using 2,2'-azino-bis(3)-bnz-thialozine-6 sulfonic acid as substrate and the reading performed at 405.

Cloning of sOSMR Spliced Form—Total RNAs from WRL68 hepatoma cell line were extracted by the TRIzol method according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). cDNA was amplified with the Advantage polymerase (Clontech, Palo Alto, CA) using 10 nM OSMR sense primer CGGCCTGCCTACCTGAAAAC and an oligo(dT) primer (Invitrogen). PCR products were cloned in the pGEMT vector (Promega), and the sequencing was performed using an automatic DNA sequencer (Beckman Coulter). To express the recombinant sOSMR, the 3'-end of the cDNA was replaced by a V5-His tag and subcloned in the pcDNA3.1D/TOPO-V5-His mammalian expression vector (Invitrogen).

Protein Expression and Purification—The human embryonic kidney 293 cell line was stably transfected with sOSMR-V5-His pcDNA3.1D/TOPO plasmid using the Exgen transfection reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Cell superna-

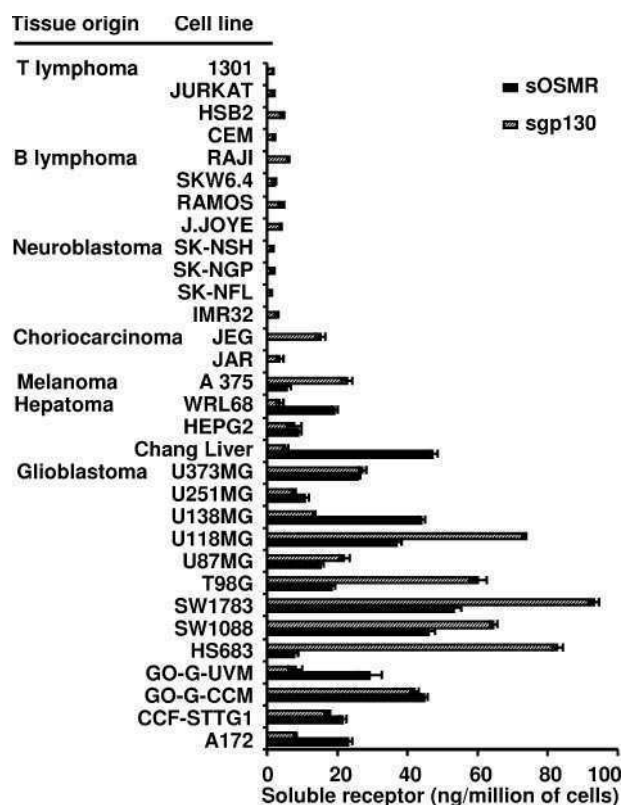


FIGURE 2. Detection of sOSMR and sgp130 in cell line supernatants. Culture media were collected after a 48-h culture. The number of cells was determined by trypan blue dye exclusion. The sOSMR and sgp130 concentrations were determined by ELISA.

tants were submitted to an anion exchange column (Amersham Biosciences) before an affinity purification step using Ni^{2+} -Sephacrose column chromatography (Amersham Biosciences). Purified fractions were desalted by size exclusion before being submitted to SDS-PAGE silver staining and Western blotting analyses. The OSMR-Fc was a fusion protein made of the extracellular part of the membrane receptor coupled to the Fc portion of human IgG1 (34). In Figs. 8B and 9E a fusion protein consisting of the first 428 residues of sOSMR fused to a 40-residue linker and to the Ig domain of gp130 (amino acids 767–817) was used. The Fc and fusion proteins were expressed in COS and human embryonic kidney 293 cell lines, respectively. The culture supernatants were collected and loaded either on a protein A-Sepharose or on a Ni^{2+} -Sepharose column and the recombinant proteins eluted. Purity and protein determination analyses were carried out by SDS-PAGE and by silver staining.

Reverse Transcription PCR Analyses—cDNAs were synthesized from 2 μg of total RNA by random hexamer primers using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). Reverse transcription products were subsequently amplified by 35 cycles of PCR using the primers for sOSMR (sense TCTGGGGAAAAGAACTTTGTAC, antisense TAAGCAGGGTCTTACTTGC), by 25 cycles of PCR using the primers for OSMR (sense TCTGGGGAAAAGAACTTTGTAC, antisense G TACTCGCGCCATGTACTCT), and by 20 cycles of PCR using the primers for GAPDH (sense ACCACAGTCCATGCCATCAC, antisense TCCACCACCTGTTGCT-

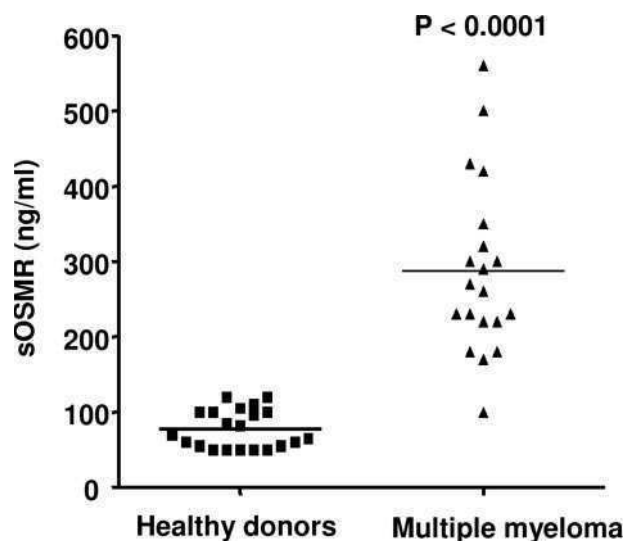


FIGURE 3. Immunodetection of sOSMR in human sera from healthy individuals and multiple myeloma-suffering patients. The sOSMR concentrations were determined by ELISA.

GTA). Amplified products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis.

Real-time Quantitative PCR—Quantitative real-time PCR was carried out using the LightCycler-FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). The cDNA tissue samples were obtained from Clontech. The reaction components were 1 \times FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I and 5 nM of the forward and reverse primers for sOSMR (forward CCTTTT-TAACCTGACTCATCG, reverse AGCAGGGTCTTACTTG-CAT), for OSMR (forward AGATTGAACTCCATGGTGAA, reverse GCTTCAAGTGTGGTGAAGTT), and for GAPDH (forward GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, reverse GAAGATGGT-GATGGGATTTTC). Data analysis was performed as indicated by Roche using the “Fit Point Method” in the Light Cycler software 3.3 (Roche Diagnostics). Quantification was made using GAPDH as a housekeeping gene.

Immunoprecipitation and Western Blotting Experiments—Cytokines and soluble receptors were preincubated at a final concentration of 5 nM each for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ before being added to the cells for 10 min. Cells were lysed in SDS sample buffer, sonicated, submitted to SDS-PAGE, and transferred onto an Immobilon membrane. The membranes were subsequently incubated overnight with the primary antibody before being incubated with the appropriate peroxidase-labeled secondary antibody for 1 h. The reaction was visualized by ECL detection according to the manufacturer’s instructions (Amersham Biosciences). Membranes were stripped in 0.1 M glycine, pH 2.8, for 2 h before reblotting.

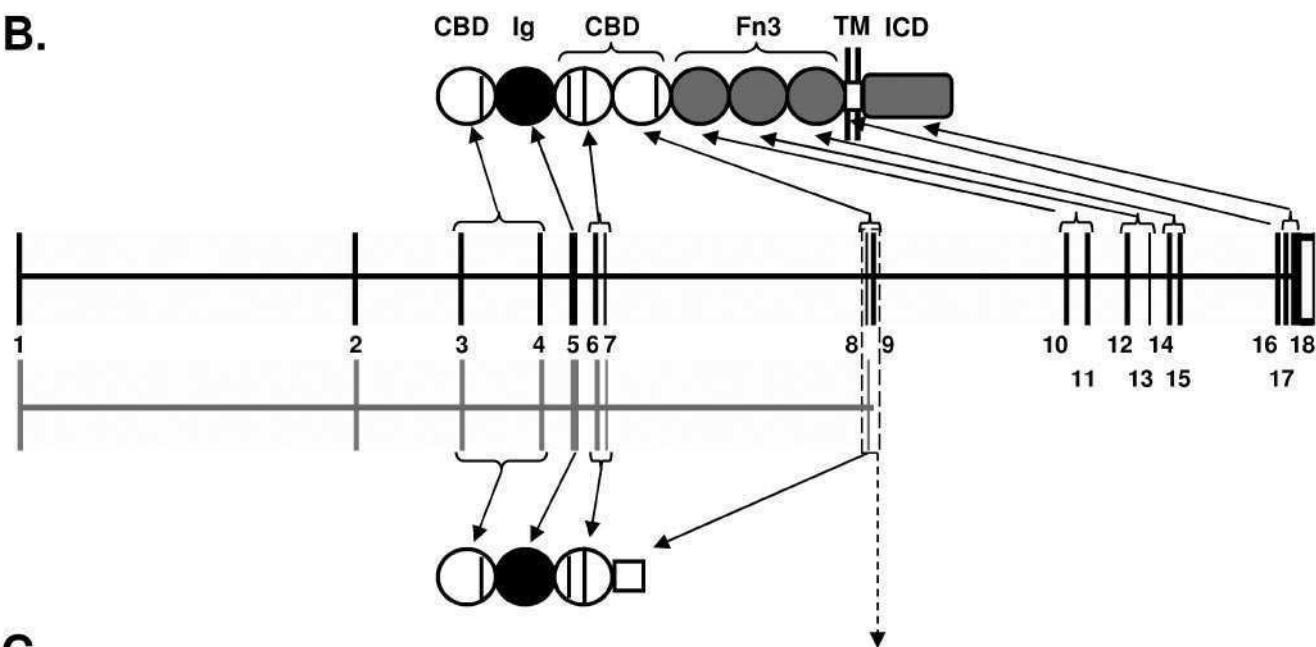
For the co-precipitation experiments, the cytokines were incubated at a concentration of 5 nM in the presence of the same concentration of soluble receptors. After an overnight contact, the proteins were precipitated using Ni^{2+} beads and analyzed by Western blotting as described above.

Endoglycosidase Treatment—The sOSMR receptor was diluted in 1% Brij 96 lysis buffer and treated with 25 units/ml of *N*-glycosidase-F (Roche) for 12 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ before Western blotting analysis.

A.

M	A	L	F	A	V	F	Q	T	T	F	F	L	T	L	L	S	L	R	T	Y	Q	S	E	V	L	26
A	E	R	L	P	L	T	P	V	S	L	K	V	S	T	N	S	T	R	Q	S	L	H	L	Q	W	52
T	V	H	N	L	P	Y	H	Q	E	L	K	M	V	F	Q	I	Q	I	S	R	I	E	T	S	N	78
V	I	W	V	G	N	Y	S	T	T	V	K	W	N	Q	V	L	H	W	S	W	E	S	E	L	P	104
L	E	C	A	T	H	F	V	R	I	K	S	L	V	D	D	A	K	F	P	E	P	N	F	W	S	130
N	W	S	S	W	E	E	V	S	V	Q	D	S	T	G	Q	D	I	L	F	V	F	P	K	D	K	15
L	V	E	E	G	T	N	V	T	I	C	Y	V	S	R	N	I	Q	N	N	V	S	C	Y	L	E	182
G	K	Q	I	H	G	E	Q	L	D	P	H	V	T	A	F	N	L	N	S	V	P	F	I	R	N	208
K	G	T	N	I	Y	C	E	A	S	Q	G	N	V	S	E	G	M	K	G	I	V	L	F	V	S	234
K	V	L	E	E	P	K	D	F	S	C	E	T	E	D	F	K	T	L	H	C	T	W	D	P	G	260
T	D	T	A	L	G	W	S	K	Q	P	S	Q	S	Y	T	L	F	E	S	F	S	G	E	K	K	286
L	C	T	H	K	N	W	C	N	W	Q	I	T	Q	D	S	Q	E	T	Y	N	F	T	L	I	A	312
E	N	Y	L	R	K	R	S	V	N	I	L	F	N	L	T	H	R	V	Y	L	M	N	P	F	S	338
V	N	F	E	N	V	N	A	T	N	A	I	M	T	W	K	V	H	S	I	R	N	N	F	T	Y	364
L	C	Q	I	E	L	H	G	E	G	K	M	M	Q	V	R	T	L	L	N	F	L	F	S	K	I	390
L	F	L	S	*																						

B.



C.

Exon 8

sOSMR V Y L M N P F S V N F E N V N A T N A I M T W K V H S I R N
 GTT TAT TTA ATG AAT CCT TTT AGT GTC AAC TTT GAA AAT GTA AAT GCC ACA AAT GCC ATC ATG ACC TGG AAG GTG CAC TCC ATA AGG AAT

mOSMR V Y L M N P F S V N F E N V N A T N A I M T W K V H S I R N

sOSMR N F T Y L C Q I E L H G E G K M M Q V R T L L N F L F S K I
 AAT TTC ACA TAT TTG TGT CAG ATT GAA CTC CAT GGT GAA GGA AAA ATG ATG CAA GTA AGA ACC CTG CTT AAT TTT CTA TTT TCA AAA ATT

mOSMR N F T Y L C Q I E L H G E G K M M Q

sOSMR L F L S *
 CTT TTT TTG TCC TGA ACAGAGACACTGATGAATAAAATCACTTTAAACTCTTATTCTGCTAGGTTCAAATGGTGTGGGTCATCTGTTTTAAAGGTCATGAAATTAATCAT
 ACACTTTTATGGTTAGGAAATGGCCCTGAAGATTTTTTCCCCCAAAGAAGAAGTATCTTACTCCAGGTCAGGATTTGCTGTGCTCTGGTTTGCCCTTTGTAATGGGATGCATCAC
 CAATGTTTCTGCTGTTCTCTTTTTCTCTTTTTCTCTCTTTTTGATCAAGCAG

FIGURE 4. Identification of a soluble OSMR spliced form. A, amino acid sequence of sOSMR. Signal peptide and WSNWS motifs are surrounded by white and gray boxes, respectively, the four conserved cysteines by circles. B, schematic representation of intron-exon organization of *osmr* gene. Module organization and implication of the corresponding exons in the formation of the membrane and soluble forms of the receptor are depicted (CBD, cytokine binding domain; Ig, immunoglobulin-like domain; Fn3, fibronectin type 3 domain; TM, transmembrane domain; ICD, intracellular domain). C, schematic representation of exon and intron 8 of the *osmr* gene. Underlined nucleotides refer to the exon 8 coding for both soluble and membrane forms of OSMR. The intron 8 encoded for 16 additional residues in the soluble form of receptor.

Proliferation Assays—Ba/F3 cell lines transfected with the appropriate cDNA receptors were seeded in 96-well plates at a concentration of 5×10^3 cells/well in RPMI 5% fetal calf serum

(39). Serial dilutions of tested cytokines or soluble receptors were performed in triplicate. After a 48-h incubation period, 0.5 μ Ci of [3 H]thymidine was added to each well for the last 4 h of

the culture and the incorporated radioactivity determined by scintillation counting (Packard Topcount luminometer, Meriden, CT).

Flow Cytometry Analysis—Cells were incubated for 30 min at 4 °C with the AN-N2 anti-OSMR antibody or an isotype control antibody (IgG1) (10 μ g/ml) before an incubation step with a phycoerythrin-conjugated anti-mouse antibody. Fluorescence was subsequently analyzed on a FACScalibur flow cytometer from BD Biosciences.

RESULTS

Detection of a Soluble Form of OSMR by ELISA—Eighteen monoclonal antibodies recognizing the soluble OSMR part of an Fc fusion protein were generated and characterized. Each of them was tested in pairs to develop a sandwich ELISA (Fig. 1A). We selected the AN-A2 anti-OSMR mAb as a coating antibody and the AN-V2 anti-OSMR mAb as a tracer antibody. The ELISA allowed the detection of 2.5 ng/ml recombinant soluble OSMR (Fig. 1B) and did not react with any other related soluble receptors (LIFR, gp130, CNTFR, CLF, IL-6R) or irrelevant receptors (soluble *Drosophila* Toll, soluble human IL-4R) (Fig. 1C). Moreover, addition of OSM to the samples did not interfere with the detection of soluble OSMR in the developed ELISA.

We next looked for a native form of sOSMR by screening culture supernatant from different cell lines. All the tested glioblastoma, hepatoma, and melanoma cell lines secreted high amounts of a soluble form of OSMR with concentrations ranging from 5 to 50 ng/10⁶ cells (Fig. 2). In contrast, we could not observe the secretion of sOSMR in neuroblastoma-, choriocarcinoma-, and lymphocyte-derived cell lines. In addition, high levels of sgp130 were detected in the cell lines secreting sOSMR.

We also looked for sOSMR in sera from healthy individuals and from patients suffering from multiple myeloma, a pathology known to induce increased levels of circulating soluble cytokine receptors (41). An average value of 77 ng/ml circulating sOSMR was measured in normal situations that reached a concentration of 288 ng/ml in multiple myeloma patients (Fig. 3). These results revealed the existence of a circulating form of OSMR that can be positively modulated in pathologic situations.

Molecular Cloning and Expression of a Soluble OSMR Splice Variant—The cloning of a soluble form of OSMR was carried out by reverse transcription PCR starting from the WRL68 hepatoma cell line. A 1185-bp cDNA was isolated and encoded a truncated soluble form of OSMR of 394 amino acids diverging from the membrane form of OSMR by 16 amino acids encoded at the end of exon 8 (Fig. 4, A–C). The soluble receptor sequence included an N-terminal potential hydrophobic signal peptide (exons 1 and 2), a half CBD containing a WSXWS motif (exons 3 and 4) followed by an Ig-like domain (exon 5), and then a half CBD presenting four conserved cysteine residues in fixed position (exons 6 to 7).

Soluble OSMR Tissue Distribution—Tissue distribution was analyzed by real-time quantitative RT-PCR using poly(A)⁺ RNA from different human tissues. Two pairs of primers were used, one specifically detecting the soluble form of receptor and

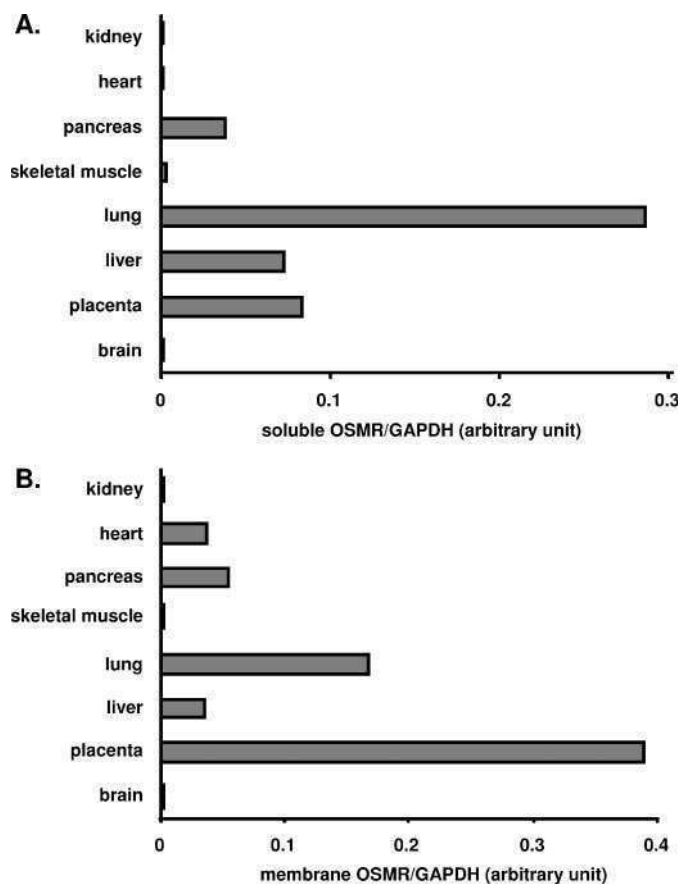


FIGURE 5. sOSMR tissue distribution. sOSMR (A) and membrane OSMR (B) expression levels were detected in tissues by quantitative reverse transcription PCR and expressed compared to GAPDH as described under "Materials and Methods."

the second one only amplifying the membrane form of OSMR. The specificity of amplified products was controlled on a large panel of cell lines and tissues, and in each case a single band corresponding to the expected molecular weight was observed on gels (data not shown). The soluble form of OSMR was expressed in pancreas, lung, liver, and placenta and weakly in skeletal muscle (Fig. 5). With the exception of heart, preferentially expressing the membrane receptor, the distribution of both forms of OSM receptors was similar in the tested tissues.

Soluble OSMR Expression and Binding of OSM to sgp130-sOSMR Complex—The sOSMR was expressed as a tagged protein (V5-histidine tags) and purified by affinity from culture supernatants of stably transfected cells (Fig. 6A). SDS-PAGE gels and Western blotting analyses of the purified fraction evidenced a 75-kDa polypeptide, corresponding, after subtracting the tag molecular mass, to a mature protein of 70 kDa. Deglycosylation experiments were carried out using the *N*-glycosidase-F. A shift of 25 kDa was observed in agreement with the predicted occupation of 10 *N*-glycosylation sites (Fig. 6B).

We next studied interaction between the OSM, sOSMR, and sgp130 (Fig. 7). The soluble receptors were added to OSM or LIF, and the tagged sOSMR was precipitated using Ni²⁺ beads. The samples were assayed by Western blotting using an anti-OSM antibody to detect its association to sOSMR. The experiments show that OSM specifically recognized sOSMR, with a slight increase of the binding in the presence of sgp130.

Characterization and Function of a Soluble OSM Receptor

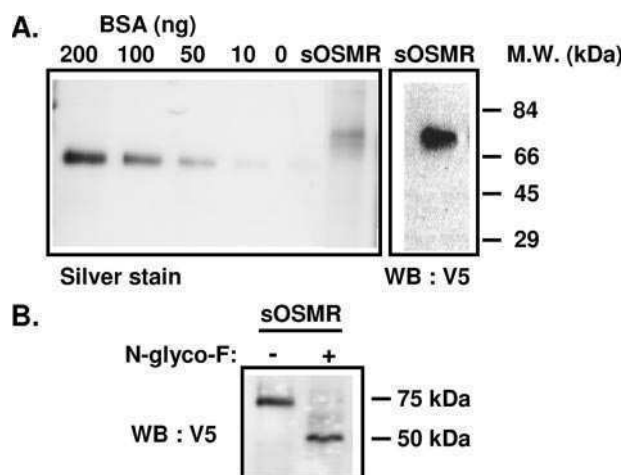


FIGURE 6. Purification of sOSMR. *A*, SDS-PAGE analysis of sOSMR purified from a Ni^{2+} -agarose column. Gel was silver stained, and a Western blotting analysis was performed on parallel lanes using the monoclonal anti-V5 tag antibody. *B*, Western blot was performed on sOSMR treated for 12 h at 37 °C with 1 unit of *N*-glycosidase-F (*N*-glyco-F). *WB*, Western blot.

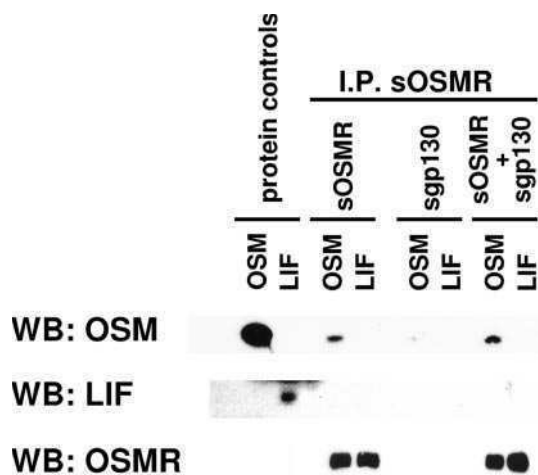


FIGURE 7. OSM-sOSMR interaction requires the presence of sgp130. 5 nM soluble receptors were incubated at 4 °C overnight in the presence of 5 nM OSM or LIF as control cytokine before the pull down of V5-His-tagged sOSMR by using Ni^{2+} beads. Associations to OSM or LIF were detected by using biotinylated polyclonal anti-OSM or anti-LIF antibodies. An anti-V5 antibody coupled to peroxidase was used to control the loading of sOSMR. *WB*, Western blot.

Soluble OSMR Neutralizes STAT3 Signaling—We tested the possibility for sOSMR to behave as an antagonist for its ligands. Experiments were carried out using the GO-G-UVM and T98G glioblastoma and A375 melanoma cell lines previously reported to be responsive to OSM (Fig. 8*A*) (1, 28). Treatment of the cells with OSM plus sgp130 showed a very slight or no decrease in STAT3 phosphorylation compared with the signal observed in the presence of OSM alone, in agreement with the published studies (42). Importantly, the combined addition of both soluble receptors induced a marked decrease of STAT3 phosphorylation in the studied cell lines. This was not observed in the presence of LIF or IL-6, used as controls (Fig. 8*B*). Recent studies have demonstrated the OSMR involvement, together with Gp130-like receptor (GPL), also known as IL-31R, in the formation of a functional IL-31 receptor complex (32–34). We tested the possibility for sOSMR to also neutralize an IL-31 response in the T98G glioblastoma cell line (Fig. 8*C*). Similarly

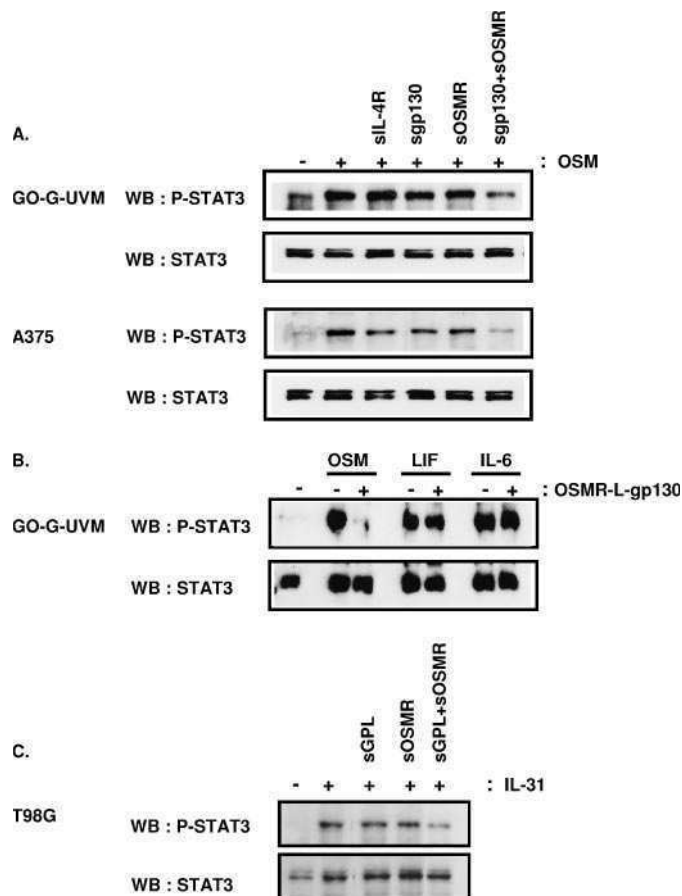


FIGURE 8. sOSMR associated to sgp130 or sGPL/IL-31R neutralizes OSM and IL-31, respectively. *A*, OSM (5 ng/ml) was preincubated with sIL-4R, sgp130, sOSMR, or sgp130 and sOSMR (200 ng/ml each) for 2 h at 37 °C. The GO-G-UVM glioblastoma and the A375 melanoma cell lines were stimulated with the studied proteins for 10 min, and the STAT3 tyrosine phosphorylation levels were determined. *B*, a fusion protein made of sOSMR linked to a gp130 soluble form neutralized specifically the OSM response. Cytokines (10 ng/ml) were preincubated with 100 ng/ml OSMR-L-gp130 for 2 h at 37 °C. Preincubated samples, or cytokines alone, were added for 10 min to the GO-G-UVM glioblastoma cell line, and the STAT3 tyrosine phosphorylation levels were determined. *C*, IL-31 (10 ng/ml) was preincubated with soluble Fc-tagged GPL (250 ng/ml), sOSMR (200 ng/ml), or a combination of both for 2 h before being added to T98G, an IL-31-responsive glioblastoma cell line. After a 10-min contact, the STAT3 tyrosine phosphorylation levels were determined.

to that observed for OSM, a decrease in STAT3 recruitment by IL-31 was observed when simultaneously adding sOSMR and soluble GPL/IL-31R to the cells. Altogether, these results indicate that a combination of truncated OSMR and gp130, or GPL/IL-31R, could trap and neutralize OSM and IL-31 responses, respectively.

Soluble OSMR Combined with Soluble gp130 Neutralizes Both Type I and Type II OSM Receptors—In the next experiment, murine IL-3-dependent BA/F3 cells engineered to specifically express type I (gp130/LIFR) or type II (GP130/OSMR) OSM receptors on their surface were used (39). Both cell lines proliferated in a similar manner with the addition of OSM to the cultures (Fig. 9, *A* and *B*). A 50% inhibition of the signal was measured when sOSMR and sgp130 were added together to the type I or type II OSM receptor-expressing BAF/3 cell cultures (Fig. 9, *C* and *D*). In contrast, no induced inhibition could be detected when type I receptor-expressing cells were grown in the presence of LIF (Fig. 9*E*). These experiments show that the

interaction between OSM and sOSMR/sgp130 was sufficient to lower the functional signals mediated by either type I or type II OSM receptors.

OSM Up-regulates Its Own Soluble Receptor—We studied the possibility of tumor cells modulating their sOSMR expression in response to OSM. Experiments were carried out using the A375 melanoma cell line and three glioblastoma cell lines. The expression levels of soluble and membrane forms of OSMR were first determined by reverse transcription PCR (Fig. 10A). A clear induction of the RNA coding for the soluble form of receptor was observed when treating A375, GO-G-UVM, and U87MG cells with OSM. Importantly, no variation in the expression level of the membrane form of the receptor could be evidenced in any studied cell line, suggesting that OSM preferentially up-regulated its soluble form of receptor (Fig. 10B and data not shown). Similar experiments were then performed at the protein level with the GO-G-UVM and A375 cell lines (Fig. 10C). The obtained results showed an increased sOSMR secretion when the cells were grown in the presence of at least 12.5 ng/ml OSM.

Further experiments were carried out to test the possibility for additional gp130 signaling cytokines (IL-6, IL-11, LIF, CT-1), pro-inflammatory cytokines (interferon γ , IL-1 α), or anti-inflammatory mediators (dexamethasone, transforming growth factor β , IL-10) to modulate sOSMR secretion (Fig. 10D). A positive modulation of sOSMR secretion was only observed in response to its cognate ligand. Together these results demonstrate that OSM positively regulates the secretion of sOSMR, opening the possibility for tumor cells to display a reduced sensitivity to the static activity of the cytokines during an immune response.

DISCUSSION

In the present work we identified an alternatively spliced form of OSM receptor leading to the generation of a soluble form of receptor. Soluble type I cytokine receptors can be generated by different mechanisms, including alternative splicing of mRNA transcripts and proteolytic shedding of receptor ectodomains. Cleavage of glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor by phosphatidylinositol-specific phospholipase C was also reported in the case of CNTFR α -chain (37).

Soluble IL-6 receptor is generated two different ways, shedding of the external IL-6R portion or alternative splicing, resulting in the secretion of a soluble form of receptor that lacks the

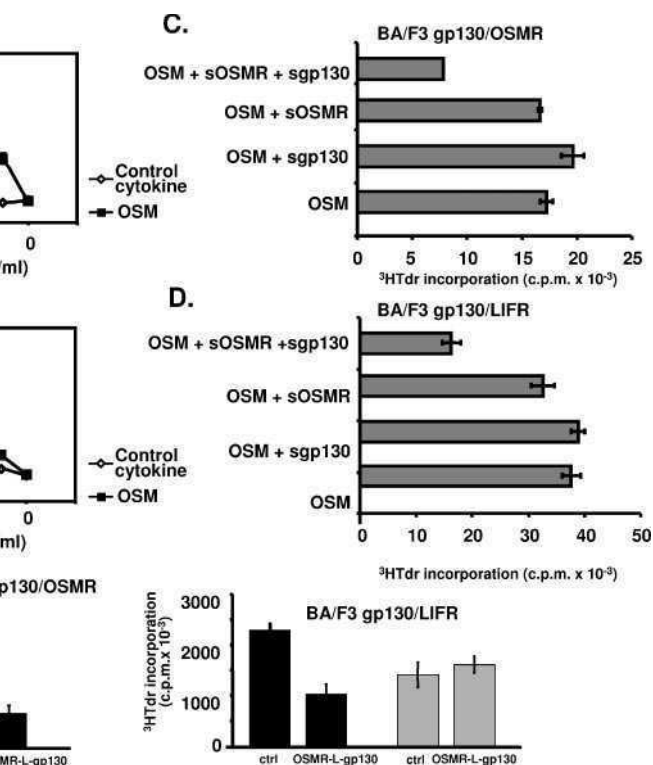


FIGURE 9. sOSMR associated to sgp130 neutralizes OSM-induced proliferation of OSMR type I- or type II-expressing BA/F3 cell lines. Proliferative response of BA/F3 cells transfected with type II (gp130/OSMR) (A) or with type I (gp130/LIFR) (B) receptors to OSM. Cells were cultured in triplicate with 3-fold dilutions of indicated cytokines. C and D, type II and type I receptor-transfected BA/F3 cells were cultured in the presence of 0.6 ng/ml OSM, 1.5 μ g/ml sgp130, and 1.5 μ g/ml sOSMR as indicated. E, 100 ng/ml OSMR-L-gp130 fused protein and 0.1 ng/ml OSM (in black) or 0.1 ng/ml LIF (in gray) were added to type I and type II receptor-expressing BA/F3 cells. After 48 h of culture, a [³H] thymidine pulse was carried out and the incorporated radioactivity determined.

transmembrane domain (43–45). Two large size signaling receptors belonging to the IL-6 family, gp130 and LIFR, have also been described as soluble products (38, 46). In these latter cases the soluble receptors have been identified as splice variants of membrane forms. In the present work we have highlighted the existence of a soluble OSMR generated by alternative splicing in intron 8 leading to a stop codon after residue 394. In parallel experiments, we also explored the possibility for soluble OSMR to be simultaneously generated by shedding processes. Preliminary results show an induction of sOSMR, after a phorbol ester cell contact, that is counteracted by a metalloprotease inhibitor treatment.⁴ This suggests that, in addition to the exon splicing mechanism, sOSMR can also be generated by proteolytic cleavage, similarly to that previously reported for the soluble IL-6R (43–45).

The binding of soluble IL-6R-IL-6 complex to membrane gp130 confers an IL-6 signaling capability named “trans-signaling” (47). This phenomenon is also reported for IL-11 or CNTF (37, 48). In contrast, sgp130 or soluble LIFR abrogate the signaling mediated by the membrane form of receptors in response to the IL-6 family members (38, 46). The present results show that sOSMR also behave as a neutralizing receptor for OSM.

⁴ C. Diveu, unpublished observations.

Characterization and Function of a Soluble OSM Receptor

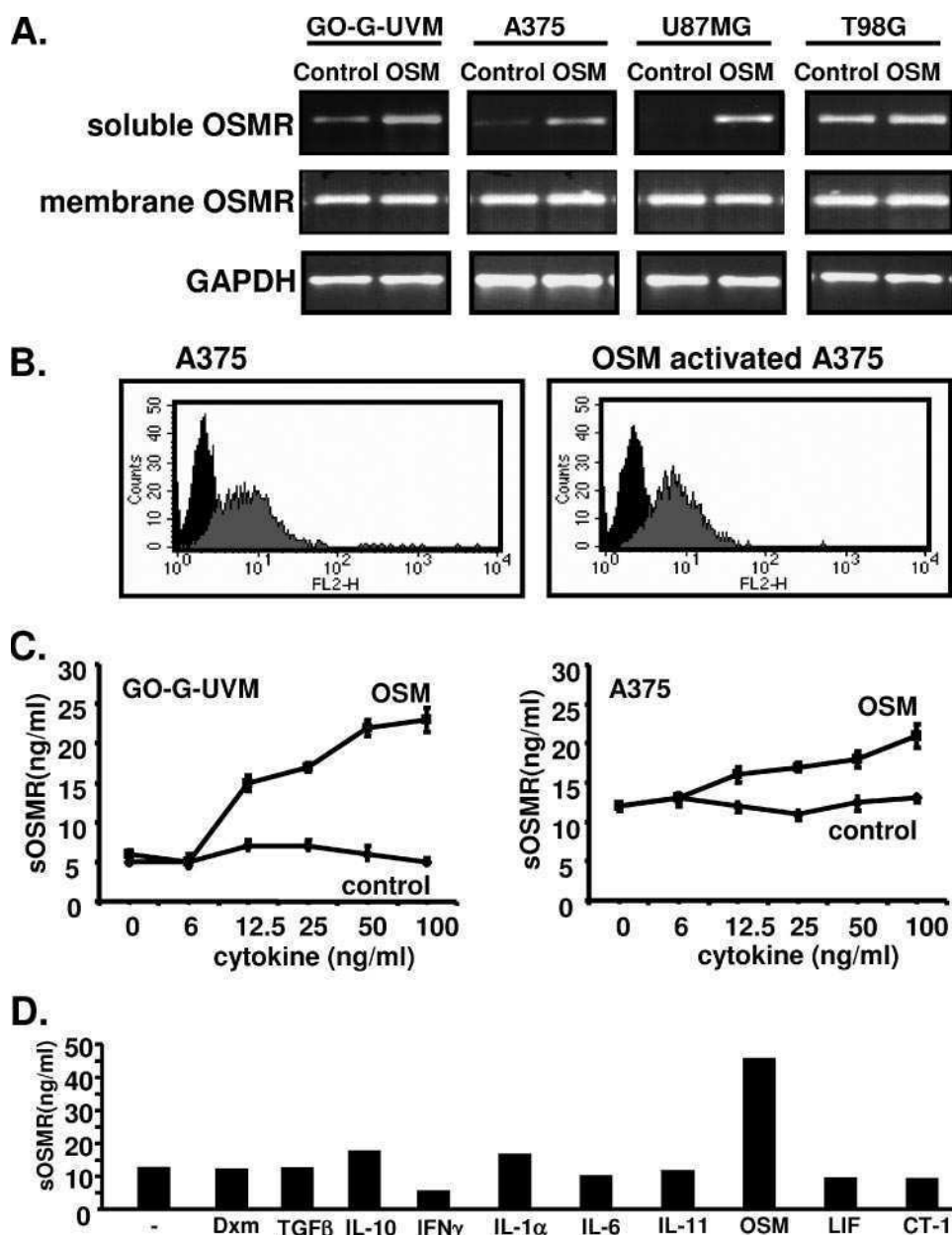


FIGURE 10. OSM up-regulates sOSMR. *A*, the GO-G-UVM, U87MG, T98G glioblastoma, and A375 melanoma cell lines were grown for 6 h in the presence of 50 ng/ml of OSM. Expression levels of soluble and membrane OSMR were determined by reverse transcription PCR using primers specifically amplifying each form of transcripts. GAPDH was used as control. *B*, the expression of OSMR membrane form remained unchanged in A375 cells grown for 48 h in the presence of 50 ng/ml OSM. Receptor expression was monitored by flow cytometry analysis. *Black histogram*, IgG1 isotype control; *gray histogram*, AN-N2 anti-OSMR staining. *C*, GO-G-UVM and A375 cell lines were grown for 48 h in the presence of serial dilutions of OSM, and the sOSMR concentrations secreted in culture supernatants were determined by ELISA. *D*, GO-G-UVM cells were grown for 48 h in the presence of 2 nM indicated cytokines or 1 nM dexamethasone (DXM). sOSMR concentrations were determined by ELISA.

The receptor-transducing chains of the IL-6 family, gp130, LIFR, and OSMR, have a modular organization containing in their ectodomain at least one Ig-like domain, a CBD, and FnIII domains (49–51). Structural analyses of this family of receptors revealed that high affinity binding of the cytokine to its receptor complex involves on one side the CBD of a first receptor subunit and on the other side the Ig-like domain of the second receptor component (50–54). We previously reported that OSM binds to the CBD of gp130 and to the Ig-like domain of

OSMR (52, 55). In the soluble form of OSMR, the CBD located downstream from the Ig-like domain was truncated and stopped after half of the module, suggesting that this truncated portion of receptor is not able to bind a cytokine. The present work supports the idea that the Ig-like domain of the soluble OSMR, which remains intact, contributes to its neutralizing potential.

Recent studies from Zymogenetics researchers and from our group reported that OSMR also associate to a gp130-like receptor, GPL or IL-31R, to generate a functional receptor for IL-31 (32–34). In the present study we have shown that sOSMR together with GPL/IL-31R could also neutralize IL-31. Because the GPL/IL-31R receptor is devoid of Ig-like module and binds IL-31 through its CBD, we can hypothesize that sOSMR on its side might also recognize IL-31 through its Ig-like domain.

sOSMR circulating levels have been detected in healthy individuals with an average value of roughly 80 ng/ml, similar to that reported for sgp130 (38). Interestingly, a clear increase was observed in sera from multiple myeloma-suffering patients, a pathology with an important inflammatory component. Analysis of circulating sOSMR in additional inflammatory or leukemia situations would bring further information about these diseases.

The results demonstrate that sOSMR requires association with sgp130 to induce a potent neutralizing response. Interestingly, in tested tumor cell lines a co-expression of both forms of soluble receptors was observed, which was further increased in the presence of OSM.

This opens the possibility for tumor cells to protect themselves against the static activities of OSM secreted by T lymphocytes and monocytes during the immune response. A similar process has already been described for Fas ligand. In this case, lung and colon tumor cells inhibited Fas ligand-induced apoptosis by overproducing a decoy receptor (56). A specific neutralization of sOSMR in tumor experimental models might improve the anti-tumoral response to OSM (28).

On the other hand, OSM has been demonstrated to induce severe inflammatory responses, notably by recruiting the hepa-

toocytes. Recently, cytokines of the IL-6 family were successfully neutralized either by using antibodies or by fused proteins encompassing truncated soluble receptors or by their association to immunoglobulin Fc fragments, opening the possibility of new treatments in inflammatory pathologies (58–61). The development of an sOSMR-sgp130 association might also be useful to contribute to reducing the inflammatory response in acute or chronic diseases.

In conclusion, the present work identified a soluble form of OSMR that displays neutralizing properties toward OSM and IL-31 when associated to sgp130 or GPL/IL-31R, respectively. Because OSMR or IL-31R gene inactivation only led to a mild decrease in platelet number or to an absence of phenotype in mice (32, 57), the development of neutralizing strategies based on the use of sOSMR in chronic pathologies should bring useful reagents with potentially weak side effects.

Acknowledgments—We thank Chris Bell for careful reviewing the manuscript. We also thank Maud Barbado for helpful technical advice.

REFERENCES

1. Zarlino, J. M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M. B., Lioubin, M. N., and Todaro, G. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 9739–9743
2. Rose, T. M., and Bruce, A. G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8641–8645
3. Brown, T. J., Lioubin, M. N., and Marquardt, H. (1987) *J. Immunol.* **139**, 2977–2983
4. Takashima, S., and Klagsbrun, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24901–24906
5. Suda, T., Chida, K., Todate, A., Ide, K., Asada, K., Nakamura, Y., Suzuki, K., Kuwata, H., and Nakamura, H. (2002) *Cytokine* **17**, 335–340
6. Richards, C. D., Brown, T. J., Shoyab, M., Baumann, H., and Gauldie, J. (1992) *J. Immunol.* **148**, 1731–1736
7. Benigni, F., Fantuzzi, G., Sacco, S., Sironi, M., Pozzi, P., Dinarello, C. A., Sipe, J. D., Poli, V., Cappelletti, M., Paonessa, G., Pennica, D., Panayotatos, N., and Ghezzi, P. (1996) *Blood* **87**, 1851–1854
8. Wallace, P. M., MacMaster, J. F., Rouleau, K. A., Brown, T. J., Loy, J. K., Donaldson, K. L., and Wahl, A. F. (1999) *J. Immunol.* **162**, 5547–5555
9. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) *Biochem. J.* **374**, 1–20
10. Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D., and Kastelein, R. A. (2002) *Immunity* **16**, 779–790
11. Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2000) *Nat. Neurosci.* **3**, 867–872
12. Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., deLapeyriere, O., Gascan, H., and Chevalier, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4827–4832
13. Boulay, J. L., O’Shea, J. J., and Paul, W. E. (2003) *Immunity* **19**, 159–163
14. Ozaki, K., and Leonard, W. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 29355–29358
15. Bazan, J. F. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6934–6938
16. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990) *Cell* **63**, 1149–1157
17. Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamashita, K., Taga, T., and Kishimoto (1993) *Science* **260**, 1808–1810
18. Nandurkar, H. H., Hilton, D. J., Nathan, P., Willson, T., Nicola, N., and Begley, C. G. (1996) *Oncogene* **12**, 585–593
19. Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., Ziegler, S. F., and Cosman, D. (1992) *Science* **255**, 1434–7
20. Davis, S., Aldrich, T. H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N. Y., and Yancopoulos, G. D. (1993) *Science* **260**, 1805–1808
21. Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R., and Kastelein, R. A. (2004) *J. Immunol.* **172**, 2225–2231
22. Gomez-Lechon, M. J. (1999) *Life Sci.* **65**, 2019–2030
23. Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S., and Cosman, D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32635–32643
24. Kuropatwinski, K. K., De Imus, C., Gearing, D., Baumann, H., and Mosley, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15135–15144
25. Hermanns, H. M., Radtke, S., Haan, C., Schmitz-Van de Leur, H., Tavernier, J., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (1999) *J. Immunol.* **163**, 6651–6658
26. Lu, C., Rak, J. W., Kobayashi, H., and Kerbel, R. S. (1993) *Cancer Res.* **53**, 2708–2711
27. Douglas, A. M., Goss, G. A., Sutherland, R. L., Hilton, D. J., Berndt, M. C., Nicola, N. A., and Begley, C. G. (1997) *Oncogene* **14**, 661–669
28. Friedrich, M., Hoss, N., Stogbauer, F., Senner, V., Paulus, W., Ringelstein, E. B., and Halfter, H. (2001) *J. Neurochem.* **76**, 1589–1592
29. Nair, B. C., DeVico, A. L., Nakamura, S., Copeland, T. D., Chen, Y., Patel, A., O’Neil, T., Oroszlan, S., Gallo, R. C., and Sarngadharan, M. G. (1992) *Science* **255**, 1430–1432
30. Miles, S. A., Martinez-Maza, O., Rezai, A., Magpantay, L., Kishimoto, T., Nakamura, S., Radka, S. F., and Linsley, P. S. (1992) *Science* **255**, 1432–1434
31. Grove, R. I., Eberhardt, C., Abid, S., Mazzucco, C., Liu, J., Kiener, P., Todaro, G., and Shoyab, M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 823–827
32. Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., Bort, S., Mudri, S., Kuijper, J. L., Bukowski, T., Shea, P., Dong, D. L., Dasovich, M., Grant, F. J., Lockwood, L., Levin, S. D., LeCiel, C., Waggle, K., Day, H., Topouzis, S., Kramer, J., Kuestner, R., Chen, Z., Foster, D., Parish-Novak, J., and Gross, J. A. (2004) *Nat. Immunol.* **5**, 752–760
33. Diveu, C., Lelievre, E., Perret, D., Lak-Hal, A. H., Froger, J., Guillet, C., Chevalier, S., Rousseau, F., Wesa, A., Preisser, L., Chabbert, M., Gauchat, J. F., Galy, A., Gascan, H., and Morel, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 49850–49859
34. Diveu, C., Lak-Hal, A. H., Froger, J., Ravon, E., Grimaud, L., Barbier, F., Hermann, J., Gascan, H., and Chevalier, S. (2004) *Eur. Cytokine. Netw.* **15**, 291–302
35. Levine, S. J. (2004) *J. Immunol.* **173**, 5343–5348
36. Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T., and Kishimoto, T. (1992) *J. Immunol.* **148**, 2175–2180
37. Davis, S., Aldrich, T. H., Ip, N. Y., Stahl, N., Scherer, S., Farruggella, T., DiStefano, P. S., Curtis, R., Panayotatos, N., Gascan, H., Chevalier, S., and Yancopoulos, G. D. (1993) *Science* **259**, 1736–1739
38. Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G. D., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993) *Blood* **82**, 1120–1126
39. Kallen, K. J., Grotzinger, J., Lelievre, E., Vollmer, P., Aasland, D., Renne, C., Mullberg, J., Myer zum Buschenfelde, K. H., Gascan, H., and Rose-John, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11859–11867
40. Weber, A. N., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J. A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K. P., Morse, M. A., Imler, J. L., and Gay, N. J. (2003) *Nat. Immunol.* **4**, 794–800
41. Lauta, V. M. (2003) *Cancer* **97**, 2440–2452
42. Sporeno, E., Paonessa, G., Salvati, A. L., Graziani, R., Delmastro, P., Ciliberto, G., and Toniatti, C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10991–10995
43. Mullberg, J., Dittrich, E., Graeve, L., Gerhartz, C., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993) *FEBS Lett.* **332**, 174–178
44. Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993) *Eur. J. Immunol.* **23**, 473–480
45. Althoff, K., Mullberg, J., Aasland, D., Voltz, N., Kallen, K., Grotzinger, J.,

Characterization and Function of a Soluble OSM Receptor

- and Rose-John, S. (2001) *Biochem. J.* **353**, 663–672
46. Zhang, J. G., Zhang, Y., Owczarek, C. M., Ward, L. D., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Yasukawa, K., and Nicola, N. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 10798–10805
47. Jones, S. A., Richards, P. J., Scheller, J., and Rose-John, S. (2005) *J. Interferon Cytokine Res.* **25**, 241–253
48. Pflanz, S., Tacke, I., Grotzinger, J., Jacques, Y., Minvielle, S., Dahmen, H., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (1999) *FEBS Lett.* **450**, 117–122
49. Bravo, J., Staunton, D., Heath, J. K., and Jones, E. Y. (1998) *EMBO J.* **17**, 1665–1674
50. Boulanger, M. J., Bankovich, A. J., Kortemme, T., Baker, D., and Garcia, K. C. (2003) *Mol. Cell* **12**, 577–589
51. Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E., and Garcia, K. C. (2003) *Science* **300**, 2101–2104
52. Plun-Favreau, H., Perret, D., Diveu, C., Froger, J., Chevalier, S., Lelievre, E., Gascan, H., and Chabbert, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 27169–27179
53. Aasland, D., Oppmann, B., Grotzinger, J., Rose-John, S., and Kallen, K. J. (2002) *J. Mol. Biol.* **315**, 637–646
54. Hammacher, A., Richardson, R. T., Layton, J. E., Smith, D. K., Angus, L. J., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Wijdenes, J., and Simpson, R. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22701–22707
55. Olivier, C., Auguste, P., Chabbert, M., Lelievre, E., Chevalier, S., and Gascan, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5648–5656
56. Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., Godowski, P. J., Wood, W. I., Gurney, A. L., Hillan, K. J., Cohen, R. L., Goddard, A. D., Botstein, D., and Ashkenazi, A. (1998) *Nature* **396**, 699–703
57. Tanaka, M., Hirabayashi, Y., Sekiguchi, T., Inoue, T., Katsuki, M., and Miyajima, A. (2003) *Blood* **102**, 3154–3162
58. Ancey, C., Kuster, A., Haan, S., Herrmann, A., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16968–16972
59. Economides, A. N., Carpenter, L. R., Rudge, J. S., Wong, V., Koehler-Stec, E. M., Hartnett, C., Pyles, E. A., Xu, X., Daly, T. J., Young, M. R., Fandl, J. P., Lee, F., Carver, S., McNay, J., Bailey, K., Ramakanth, S., Hutabarat, R., Huang, T. T., Radziejewski, C., Yancopoulos, G. D., and Stahl, N. (2003) *Nat. Med.* **9**, 47–52
60. Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Maeda, K., Kuritani, T., Deguchi, H., Sato, B., Imai, N., Suemura, M., Kakehi, T., Takagi, N., and Kishimoto, T. (2003) *J. Rheumatol.* **30**, 1426–1435
61. Renne, C., Kallen, K. J., Mullberg, J., Jostock, T., Grotzinger, J., and Rose-John, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27213–27219

Résultats complémentaires: étude fonctionnelle de l'antagoniste de l'OSM

Seuls quelques résultats préliminaires, concernant l'antagoniste de l'OSM, ont été publiés dans l'article précédent. Cependant, nous avons réalisé une étude fonctionnelle plus approfondie de cet antagoniste. Il m'a donc paru important de présenter ces résultats qui représentent une partie de mon travail de thèse. Nous envisageons de tester l'antagoniste *in vivo* afin de compléter cette étude et ainsi de publier l'ensemble de ces résultats.

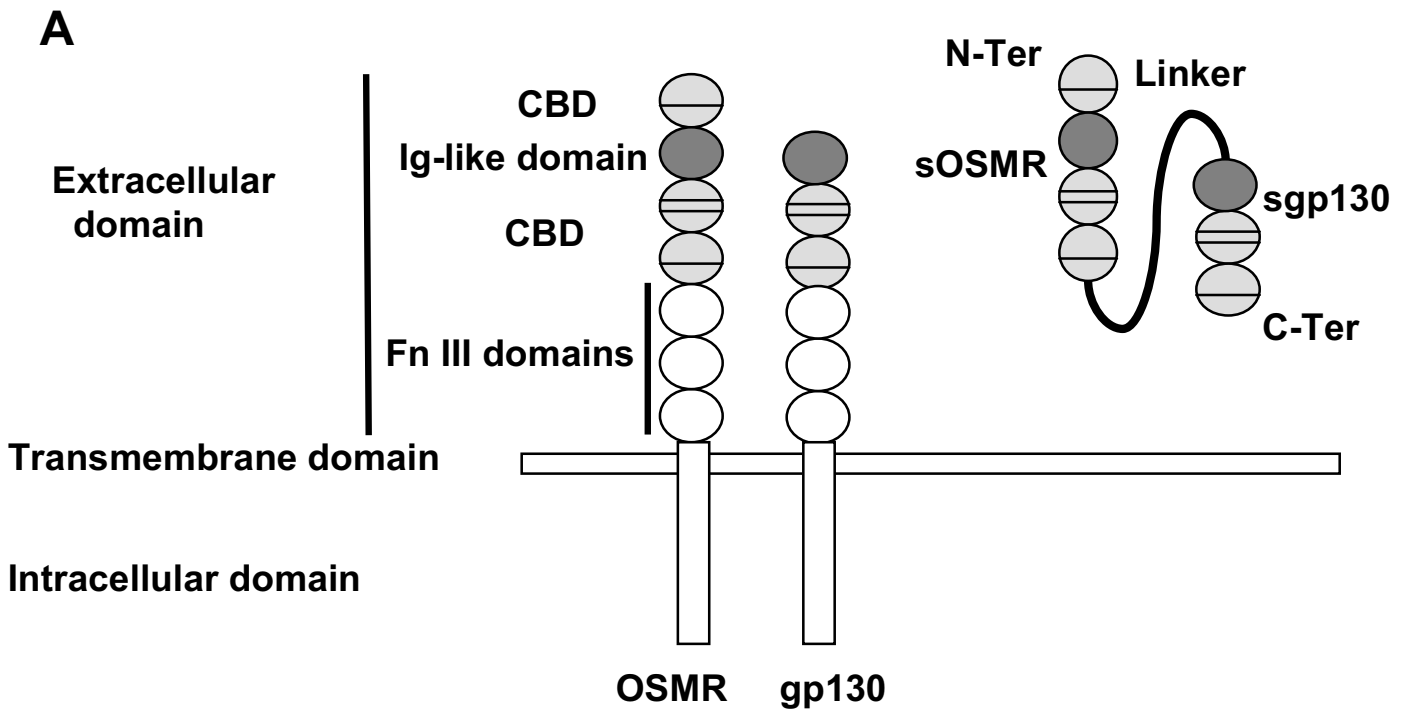
Comme nous l'avons vu précédemment, l'antagoniste est constitué des domaines CBD et « Ig-like » de l'OSMR d'une part et des domaines CBD et « Ig-like » de gp130 d'autre part (Figure 1A). Cette protéine est ainsi constituée de 817 acides aminés (Figure 1B). Nous avons conservé le peptide signal de l'OSMR afin que la protéine soit sécrétée. Deux étiquettes ont été ajoutées à l'extrémité C-terminale de la protéine. L'étiquette V5 permet la détection de l'antagoniste par western-blot et l'étiquette His permet sa purification par affinité sur des colonnes de Nickel. Nous avons produit la protéine en système eucaryote grâce à la transfection de cellules HEK 293. Afin de vérifier la pureté de la protéine, nous avons réalisé un gel d'argent et un western-blot anti-V5 en parallèle (Figure 2A). L'antagoniste présente une masse moléculaire apparente de 160kDa. Nous avons ensuite réalisé des expériences de co-immunoprécipitation afin de vérifier la conformation et l'intégrité de la protéine de fusion (Figure 2B). Ainsi, nous avons précipité la protéine avec un anticorps dirigé contre sa partie OSMR puis nous avons réalisé un western-blot avec un anticorps dirigé contre sa partie gp130. La protéine est donc bien constituée d'une partie de l'OSMR et d'une partie de gp130. Afin de vérifier son interaction avec son ligand, l'OSM, des expériences de coprécipitations ont été réalisées (Figure 3). Nous avons utilisé des cytokines chimériques, fusionnées avec un fragment Fc, que nous avons mises au contact de l'antagoniste. Nous avons ensuite précipité ces cytokines, grâce à des billes de protéine A, puis nous avons réalisé un western-blot anti-V5 afin de détecter la présence de l'antagoniste. Nous avons ainsi mis en évidence l'interaction spécifique de l'antagoniste avec l'OSM. En effet, l'IL-31 a été utilisée comme contrôle car elle se fixe également à l'OSMR et nous n'avons pas observé d'interaction entre cette cytokine et l'antagoniste dans les mêmes conditions. Cette spécificité a été confirmée, comme nous l'avons vu précédemment dans l'article, par des expériences de signalisation cellulaire dans lesquelles l'antagoniste inhibe l'OSM mais n'a aucun effet sur les réponses induites par l'IL-6 ou le LIF.

Nous avons alors étudié l'activité antagoniste de la protéine de fusion. Dans un premier temps, nous avons analysé la capacité de l'antagoniste à piéger la cytokine et ainsi à

inhiber son interaction avec le récepteur membranaire. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de cytométrie en flux (Figure 4). Un décalage du pic est observé lorsque l'on ajoute de l'OSM aux cellules : il s'agit de la fixation de l'OSM sur les cellules. Cette fixation est fortement inhibée quand la cytokine est préincubée avec l'antagoniste. Nous avons ensuite analysé les voies de signalisation intracellulaire activées par l'OSM, en particulier les voies des STATs et des MAPKs. Nous avons réalisé un effet dose de la protéine de fusion afin d'évaluer son potentiel antagoniste grâce au calcul du ratio cytokine/antagoniste (Figure 5). Nous avons ainsi observé qu'un ratio de 1/1 est suffisant pour inhiber l'activation de STAT1 et des MAPKs (ERK1/2) en réponse à l'OSM. Quant à STAT3, son inhibition nécessite une quantité plus importante d'antagoniste. En effet, il faut 4 à 8 fois plus d'antagoniste dans ce cas. Cette différence entre les voies de signalisation s'explique par le fait que STAT3 est décrit comme étant le facteur de transcription principalement recruté par l'OSM et son activation nécessite une quantité d'OSM inférieure à celle nécessaire pour l'activation de STAT1 ou des MAPK.

Des expériences de prolifération cellulaire ont ensuite été réalisées grâce à la lignée BA/F3 transfectée avec le récepteur de type II de l'OSM (OSMR et gp130) mais également avec celui de l'IL-31 (OSMR et GPL). Ces deux cytokines induisent ainsi la prolifération de ces cellules de manière dose-dépendante (Figure 6). Nous avons ainsi observé que l'antagoniste inhibe la prolifération induite par l'OSM de manière dose-dépendante mais il n'a aucun effet sur celle induite par l'IL-31. Cette expérience confirme une fois de plus la spécificité de l'antagoniste pour l'OSM. Nous avons ensuite mis en évidence que l'antagoniste est également spécifique d'espèce. Pour cela, nous avons généré un antagoniste de l'OSM murine sur le même modèle structural. L'OSM humaine, mais également murine, induisent la phosphorylation de STAT3 dans la lignée myoblastique murine C2C12. Nous avons donc testé l'activité des deux antagonistes sur cette lignée. Ainsi, l'antagoniste humain inhibe l'activation de STAT3 en réponse à l'OSM humaine mais il n'a aucun effet sur l'OSM murine (Figure 7A). A l'inverse, l'antagoniste murin inhibe la réponse induite par l'OSM murine sans interférer avec celle induite par l'OSM humaine dans ces mêmes conditions (Figure 7B). Il était donc nécessaire de générer cet antagoniste murin afin de pouvoir réaliser des expériences *in vivo* chez la souris. Nous avons récemment testé son activité *in vivo* dans un modèle de cicatrisation chez la souris. Ces travaux sont réalisés en collaboration avec l'équipe de Jean-Claude Lecron à Poitiers et des résultats préliminaires semblent montrer un effet bénéfique de l'antagoniste dans la cicatrisation. Des expériences supplémentaires sont en

cours afin de confirmer ces résultats et de mettre en évidence les gènes dont l'expression est modulée par l'OSM et son antagoniste.



B

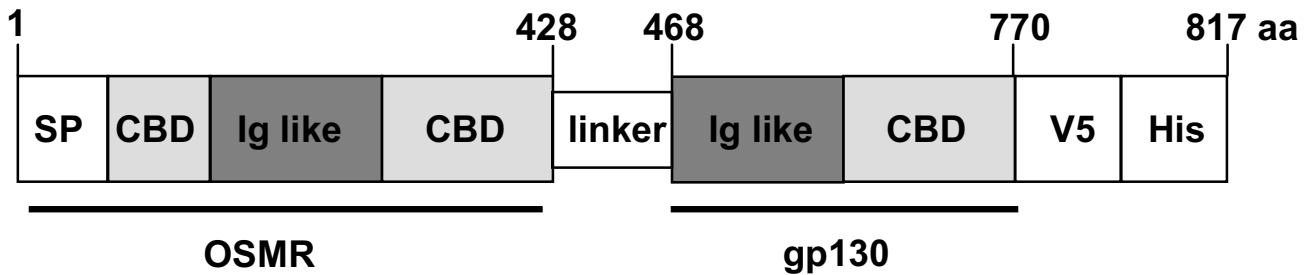


Figure 1. Schematic representations of the type II OSM receptor and of the OSMR-L-gp130 fusion protein. A. Schematic representations of the modular structure of type II OSM receptor components: OSMR and gp130, and of the fusion protein OSMR-L-gp130. The fusion protein contained the CBDs and the Ig-like domain of OSMR bound to the CBD and Ig-like domain of gp130. The linker consisted of a short flexible fragment of the extracellular proximal part of the IL-6R α chain. CBD, Cytokine Binding Domain; Ig-like, Immunoglobulin like; Fn III, Fibronectin III. **B.** Schematic representation of the fusion protein OSMR-L-gp130. Numbers refer to the amino acid positions in the fusion protein. SP, Signal Peptide.

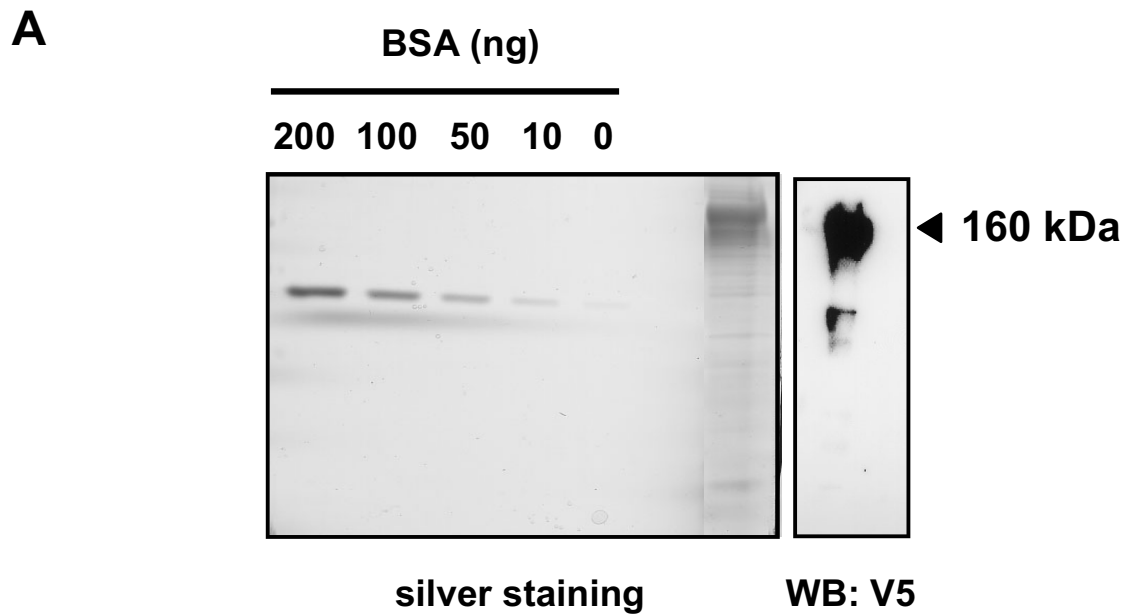


Figure 2. Detection and biochemical analysis of OSMR-L-gp130. **A.** OSMR-L-gp130 purified from a Ni⁺ agarose column was analysed by SDS-PAGE. The gel was silver stained and western-blotting analysis performed using a monoclonal anti-V5 tag antibody. WB, Western-Blot. **B.** Cos-M6 cells were transfected with the mock vector or the vector-encoding OSMR-L-gp130. Cell supernatants were immunoprecipitated with an isotype control monoclonal antibody (IgG1, 5 µg/ml) or with a monoclonal anti-OSMR antibody (AN-V2, 5 µg/ml). Immunorevelation was performed using an anti-gp130 polyclonal antibody (AN-G30, 1 µg/ml). IP, immunoprecipitation; WB, Western-blot.

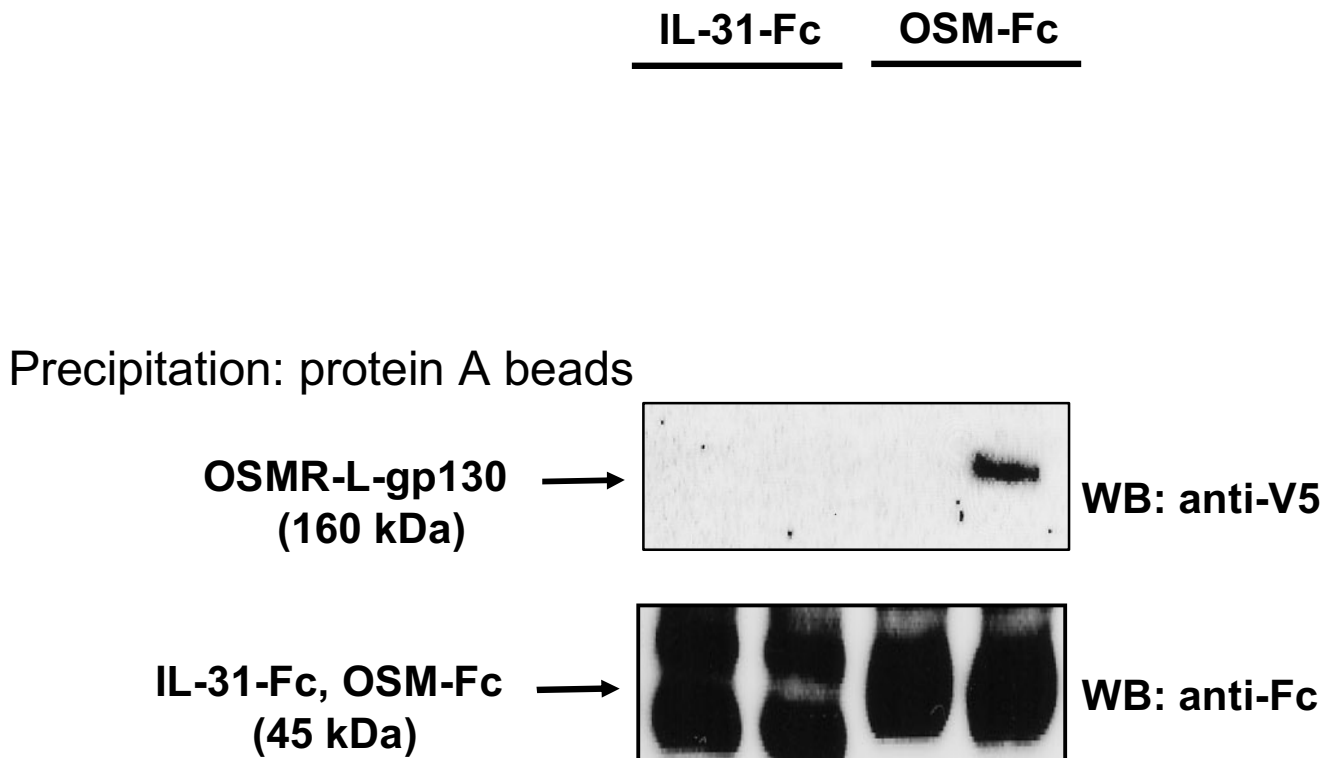


Figure 3. Binding analysis of OSMR-L-gp130. Cytokines fused to the IgG1 Fc fragment (50 ng/ml) were incubated in the presence of 600 ng/ml OSMR-L-gp130 for 16 h at 4°C before a pull-down with protein A beads. The OSM/OSMR-L-gp130 association was detected using a monoclonal anti-V5 antibody coupled to peroxidase. An anti-IgG1 polyclonal antibody coupled to peroxidase was used to control the cytokines-Fc loading. IP, Immunoprecipitation; WB, Western-Blot.

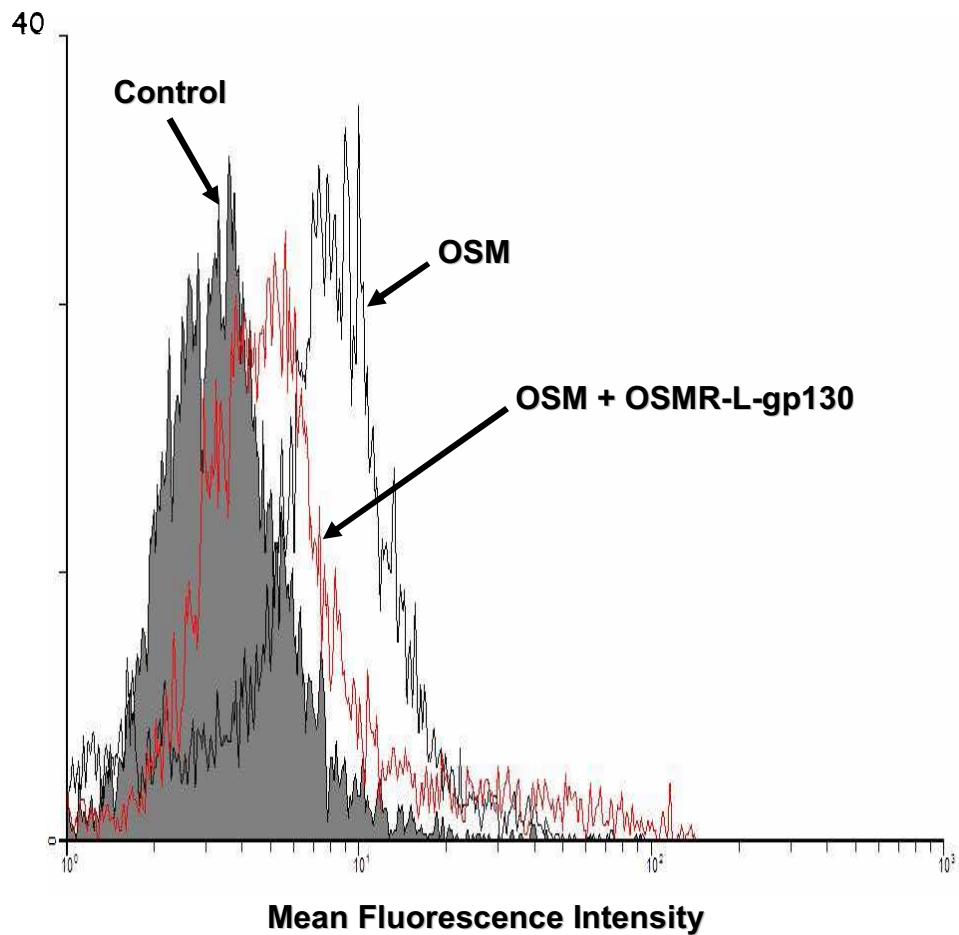


Figure 4. Inhibition of OSM binding on cells by OSMR-L-gp130. 50 ng/ml of OSM was incubated in the presence, or not, of 10 μ g/ml OSMR-L-gp130 for 2 h at 37°C before incubation on glioblastoma cell line for 10 min at 4°C. The OSM binding on cells was detected by flow cytometry using a monoclonal anti-OSM antibody (AN-OS3).

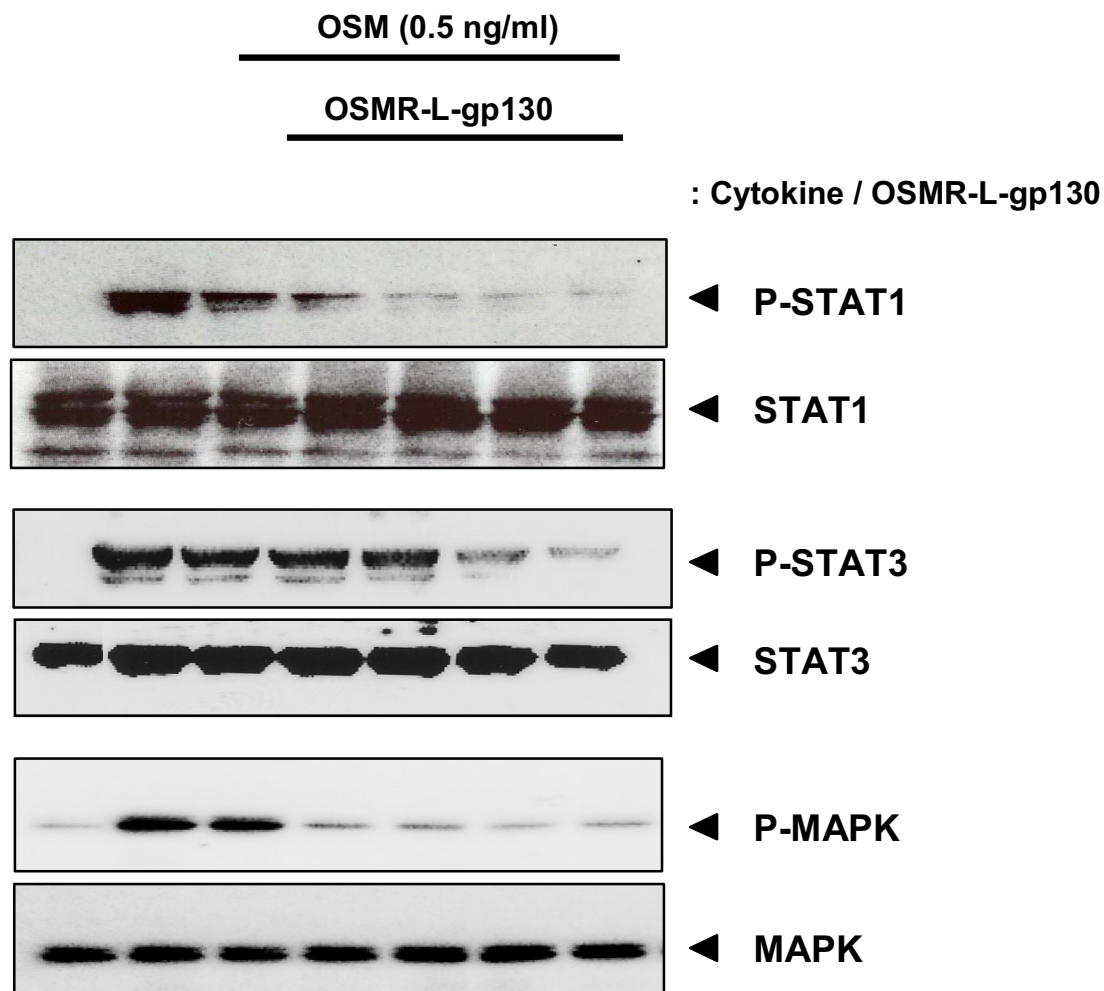


Figure 5. OSMR-L-gp130 neutralized OSM signaling. 0.5 ng/ml of OSM were pre-incubated with increasing concentrations of purified OSMR-L-gp130 (21, 43, 85 and 171 ng/ml), or with PBS control, for 2 h at 37°C. Mixed reagents were added to the Go-G-UVM glioblastoma cell line for 10 min at 37°C. The STAT-1, STAT-3 and MAPK phosphorylation levels were determined by western-blot analyses using antibodies directed against the active forms of the signaling proteins. The blots were stripped and then reblotted with the appropriate antibody recognizing all protein forms. STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase.

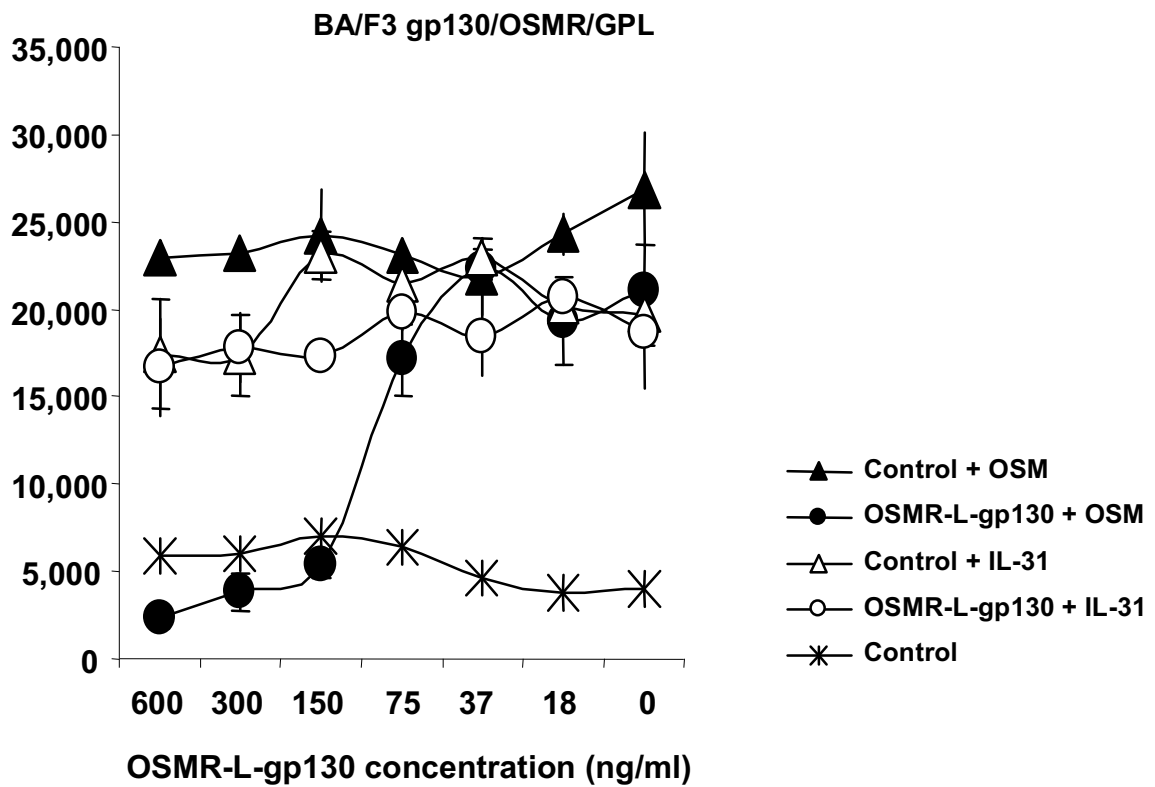


Figure 6. OSMR-L-gp130 neutralized the OSM-induced proliferation of BA/F3 cells. BA/F3 cells stably transfected with OSM and IL-31 receptor components were cultured in triplicate with 2-fold dilutions of purified OSMR-L-gp130, or an equivalent volume of PBS, and fixed amounts of OSM (0.2 ng/ml) or IL-31 (2.2 ng/ml). After a 48h culture period a ³H thymidine pulse was carried out for 4 hours, and the amount of incorporated radioactivity was determined.

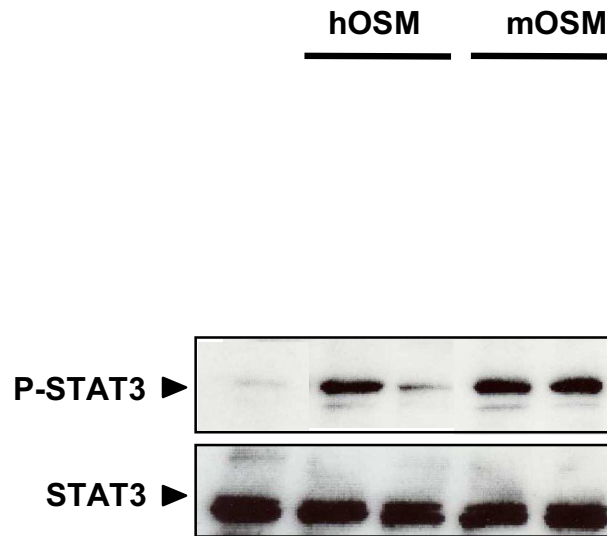
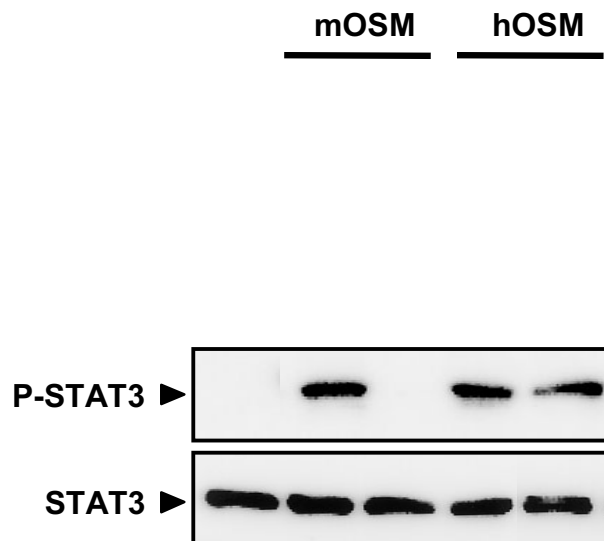
A**B**

Figure 7. OSMR-L-gp130 neutralized OSM signaling in a species specific manner. **A-B.** 5 ng/ml of human or murine OSM were pre-incubated with purified human or murine OSMR-L-gp130, or with PBS control, for 2 h at 37°C. Mixed reagents were added to the C2C12 myoblastic cell line for 10 min at 37°C. The STAT-3 phosphorylation levels were determined by western-blot analyses using antibodies directed against the active forms of the signaling proteins. The blots were stripped and then reblotted with the appropriate antibody recognizing all protein forms. STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription.

Article 2

Definition and characterization of an inhibitor for interleukin-31

Venereau E., Diveu C., Grimaud L., Ravon E., Froger J., Preisser L., Chevalier S., Gascan H.

Soumis pour publication

1. Génération et caractérisation de l'antagoniste de l'IL-31

L'IL-31 est une cytokine récemment identifiée et par conséquent, elle est peu décrite à ce jour. Cependant, il a été mis en évidence que de manière similaire à l'OSM, cytokine avec laquelle elle partage une chaîne réceptrice, elle est impliquée dans l'inflammation cutanée et plus particulièrement dans une pathologie cutanée : la dermatite atopique. Dans une perspective thérapeutique, nous avons choisi de générer un antagoniste de cette cytokine.

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différentes stratégies afin d'inhiber les cytokines. Nous nous sommes particulièrement intéressés à une nouvelle génération d'antagonistes qui consiste à construire des récepteurs solubles. Nous avons ainsi généré un antagoniste de l'IL-31 sur le même modèle que celui de l'OSM. Il est constitué des domaines CBD et « Ig-like » de l'OSMR d'une part et du domaine CBD de GPL d'autre part (Figure 1A). Nous avons utilisé le même peptide de liaison que pour l'antagoniste de l'OSM. Ce peptide de liaison correspond à la courte partie extracellulaire proximale à la région transmembranaire de l'IL-6R α . Nous avons conservé le peptide signal de l'OSMR afin que la protéine soit sécrétée. Deux étiquettes (V5 et His) ont été ajoutées à l'extrémité C-terminale de la protéine afin de faciliter sa purification et sa détection par western-blot. La protéine de fusion est ainsi constituée de 720 acides aminés (Figure 1B).

Afin de produire la protéine en système eucaryote, nous avons transfecté des cellules HEK 293. Après une étape de chromatographie d'échange d'anions, nous avons purifié la protéine par affinité grâce à son étiquette His. Nous avons ensuite réalisé un gel d'argent et un western-blot, avec un anticorps dirigé contre l'étiquette V5 de la protéine, afin de contrôler la pureté de la protéine produite (Figure 2A). La protéine de fusion, nommée OSMR-L-GPL, présente une masse moléculaire apparente de 150kDa. Afin de vérifier sa conformation, nous avons réalisé des expériences d'immuno-précipitation en utilisant un anticorps dirigé contre la partie OSMR de la protéine (Figure 2B). Nous avons ensuite révélé la protéine par western-blot en utilisant un anticorps dirigé contre la partie GPL de la protéine. Nous avons ainsi mis

en évidence que l'antagoniste est bien constitué d'une partie de l'OSMR et d'une partie de GPL. La protéine est produite en système eucaryote et par conséquent, elle est glycosylée. La protéine déglycosylée, à l'aide d'une N-déglycosidase, présente une masse moléculaire apparente de 125kDa (Figure 2C).

2. Mise en évidence de la spécificité de l'antagoniste

Nous avons réalisé des expériences de coprécipitations afin de mettre en évidence l'interaction de l'antagoniste avec son ligand, l'IL-31 (Figure 3). Des protéines chimériques, constituées de la cytokine fusionnée à un fragment constant (Fc) d'une immunoglobuline, ont été utilisées. L'IL-31-Fc ou l'OSM-Fc sont alors précipitées par des billes de protéine A. Nous avons ensuite révélé la présence de l'antagoniste par western-blot avec un anticorps dirigé contre son étiquette V5. Nous avons ainsi mis en évidence l'interaction de l'antagoniste avec l'IL-31 par des expériences de coprécipitations. Cette interaction est spécifique car aucune interaction de l'antagoniste avec l'OSM n'a été observée dans les mêmes conditions. En effet, l'antagoniste est constitué d'une partie de l'OSMR et il était donc nécessaire de vérifier si cette partie de l'antagoniste n'était pas suffisante pour interagir avec l'OSM.

Afin d'étudier l'activité antagoniste de la protéine de fusion, nous avons analysé les voies de signalisation activées par l'IL-31. Nous avons démontré dans une étude précédente que l'IL-31 induit l'activation de la voie des STATs et des MAPKs dans la lignée de glioblastome GO-G-UVM. Nous avons donc étudié la phosphorylation de STAT-1, STAT-3 et des MAPKs (ERK1/2) en réponse à l'IL-31 dans cette lignée cellulaire (Figure 4A). L'antagoniste inhibe les phosphorylations induites par l'IL-31 mais il n'exerce aucun effet sur celles induites par l'OSM. Des résultats similaires ont été observés lors d'expériences de gène rapporteur (Figure 4B). Afin d'évaluer le potentiel antagoniste d'OSMR-L-GPL, nous avons réalisé un effet dose de la protéine dans un test de phosphorylation de STAT3 en réponse à l'IL-31 ou à l'OSM (Figure 4C). Nous avons ainsi démontré qu'un ratio équimolaire d'IL-31 et d'antagoniste est suffisant pour inhiber l'activation induite par l'IL-31. A l'inverse, l'antagoniste n'inhibe pas l'activation induite par l'OSM malgré des quantités croissantes d'antagoniste. L'ensemble de ces résultats confirme la spécificité de l'antagoniste pour l'IL-31, déjà observée dans les expériences de coprécipitations.

3. Activités biologiques de l'antagoniste

Nous avons ensuite étudié l'antagoniste dans des tests de prolifération cellulaire. Nous disposons au laboratoire de la lignée BA/F3 transfectée avec les chaînes réceptrices de l'IL-31

(OSMR et GPL) et de l'OSM (OSMR et gp130). Ainsi, ces deux cytokines induisent la prolifération de cette lignée de manière dose-dépendante. Comme attendu, OSMR-L-GPL inhibe la prolifération induite par l'IL-31 et il n'exerce aucun effet sur celle induite par l'OSM (Figure 5).

L'IL-31 est une cytokine encore peu connue mais elle partage la chaîne réceptrice OSMR avec l'OSM et par conséquent, ces deux cytokines peuvent exercer des activités biologiques similaires. L'OSM a été décrite pour ses propriétés cytostatiques sur certaines lignées tumorales telles que des lignées dérivées de glioblastomes. De manière similaire à l'OSM, l'IL-31 inhibe la prolifération naturelle des cellules de la lignée GO-G-UVM (Figure 6A). Les deux cytokines induisent également des modifications morphologiques des cellules. En présence de ces cytokines, les cellules s'arrondissent et perdent leurs prolongements cellulaires (Figure 6B). L'antagoniste reverse les effets induits par l'IL-31, qu'il s'agisse de la prolifération cellulaire ou des changements morphologiques, mais il n'inhibe pas les effets induits par l'OSM.

Lors d'une étude précédente réalisée par PCR quantitative, nous avons mis en évidence les gènes dont l'expression est modulée par l'OSM et l'IL-31 dans la lignée GO-G-UVM. Ces gènes codent principalement pour des protéines à activité proinflammatoire. En se basant sur ce criblage, nous avons choisi d'étudier quelques gènes (IL-6, OSMR, VEGFa, CXCL16 et SOCS3) afin de tester l'antagoniste. Ce dernier inhibe l'expression des gènes induits par l'IL-31 sans moduler l'expression de ces mêmes gènes induits par l'OSM.

Enfin, nous avons mis en évidence dans une autre étude que l'OSM est un puissant activateur des kératinocytes et qu'il est impliqué dans l'inflammation cutanée. De façon similaire, l'IL-31 est impliquée dans une pathologie cutanée inflammatoire : la dermatite atopique. Nous avons donc étudié l'activité de l'antagoniste sur une culture primaire de kératinocytes. L'OSM et l'IL-31 induisent le recrutement de STAT3 dans les kératinocytes et l'antagoniste inhibe cette activation de STAT3 en réponse à l'IL-31 sans interférer avec la réponse induite par l'OSM.

Cette étude décrit donc un antagoniste spécifique de l'IL-31, cytokine récemment identifiée et impliquée dans l'inflammation cutanée. Elle contribue ainsi au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement de pathologies associées à cette nouvelle cytokine, en particulier des pathologies cutanées.

DEFINITION AND CHARACTERIZATION OF AN INHIBITOR FOR INTERLEUKIN-31

Emilie Venereau, Caroline Diveu, Linda Grimaud, Elisa Ravon, Josy Froger, Laurence Preisser, Sylvie Chevalier and Hugues Gascan.

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U564, F-49033 Angers, France

Running title: Characterization and function of a fused soluble interleukin-31 antagonist.

Correspondence to Hugues Gascan, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U564, 4 rue Larrey, F-49033 Angers, France

Tel. +33-2-41-35-47-31, Fax. +33-2-41-73-16-30; E-Mail: gascan@univ-angers.fr

Interleukin-31 (IL-31) is a recently described T cell derived cytokine, mainly produced by T helper type 2 cells, and related to the cytokines of IL-6 family according to its structure and receptor. IL-31 is the ligand for a heterodimeric receptor composed of a gp130-like receptor (GPL) associated with the oncostatin M receptor (OSMR). A link between IL-31 and atopic dermatitis was shown by studying the phenotype of IL-31 transgenic mice and IL-31 gene haplotypes in patients suffering from dermatitis. In this study, we generated a potent IL-31 antagonist formed by external portions of OSMR and GPL fused with a linker. This fusion protein, "OSMR-L-GPL" consisting of 720 amino acids counteracted the binding of IL-31 to its membrane receptor complex, and the subsequent signaling events involving the STATs and MAP kinase pathways. Neutralizing effects were also found in IL-31 sensitive cell lines including brain-derived cells and primary cultures of keratinocytes.

Interleukin-31 (IL-31) is a newly described T cell-derived cytokine, mostly produced by T helper type 2 cells, and involved in promoting skin disorders and regulating other allergic diseases such as asthma (1-5). This cytokine is related to the IL-6 cytokine family by its structure and receptor complex (6). IL-31 is a four-helix bundle cytokine comprising two long cross-over loops and one short loop (1). Its heterodimeric receptor is composed of gp130-like receptor (GPL, also known as GLM-R) (7,8) and oncostatin M receptor (OSMR) (9,10).

GPL was recently cloned as a member of the type I cytokine receptor family (7,8). Its name reflects its close relationship to gp130, the

shared receptor subunit of the IL-6-type cytokines (11,12). Both receptor genes are located in tandem on chromosome 5. GPL displays common structural motifs with the family of type I cytokine receptors, *i.e.*, the cytokine-binding domain (CBD) with two pairs of conserved cysteine residues and a WSXWS box in the extracellular region. IL-31 binds to GPL before recruiting OSMR to form the high affinity receptor. On the other hand, OSMR can also heterodimerize with gp130 to form a functional type II OSM receptor (9,10). The type I OSM receptor consists of the low affinity chain LIFR associated with gp130 (13,14).

High expression levels of GPL have been found in tissues involved in reproduction, the myelo-monocytic lineage, spleen, thymus, lungs, skin and trachea (7,8). In addition, OSMR is also co-expressed in most of these tissues (10). The binding of IL-31 to its receptor leads to an intracellular activation via recruitment of the Jak1, Jak2, STAT-1, STAT-3, STAT-5 signaling pathways, as well as the Pi3-kinase/Akt cascade. SHP-2 and Shc adapter molecules are also recruited and contribute to an increased activation of the MAP kinase pathway in response to IL-31 (15-17).

Dillon et al. showed that mice treated with intradermal injection of IL-31 or transgenic mice overexpressing IL-31 presented increased scratching behavior and developed severe dermatitis (1). An association of IL-31 with atopic dermatitis was found in the IL-31 transgenic mice phenotype that mimics the human pathology (18).

Sonkoly and his collaborators have demonstrated the involvement of IL-31 in atopic skin inflammation (5). Specifically, IL-31 is significantly overexpressed in pruritic atopic

compared with nonpruritic psoriatic skin inflammation. Moreover, atopic individuals have an increased tendency to produce higher levels of IL-31 in response to external trigger factors, which may contribute to the development of pruritus (19). Circulating CLA⁺ T cells produce IL-31 after activation and CLA⁺ skin-homing T cells, located in the epidermis of patients with atopic dermatitis, express IL-31 mRNA (3). Thus, IL-31 may contribute to the development of atopic dermatitis-induced skin inflammation and pruritus.

Soluble cytokine receptors, which are involved in the regulation of a number of physiological and pathological situations, can behave either as agonists or antagonists for a cytokine. The soluble counterparts of α -membrane chains, such as soluble IL-6 or CNTF receptors, are able to increase the functional responses to their respective ligands (20,21). In contrast, β -chain-derived soluble receptors, such as soluble gp130 or soluble OSMR, can neutralize the responses to IL-6, IL-11, CNTF, OSM and IL-31 (22-24).

A new generation of cytokine antagonists has been designed based on the fusion of soluble receptor fragments to trap their cognate ligand with a high affinity. To associate the external portions of receptor chains, two strategies have been used: fusing soluble(s) receptor(s) to the Fc domain of human IgG1 (25), or fusing two different ligand-binding domains together with a linker (26,27).

In the present study, we generated a potent IL-31 antagonist consisting of the distal domains of OSMR associated through a linker to the GPL cytokine binding domain. This fusion protein, named "OSMR-L-GPL," specifically recognized IL-31, and displayed potent neutralizing activities on a number of different IL-31 responsive tissues.

MATERIALS AND METHODS

Cells and reagents

Cos-M6, HEK 293 and Go-G-UVM cell lines were cultured in RPMI medium 1640 supplemented with 10% fetal calf serum. Ba/F3 stably transfected with gp130, OSMR and GPL were grown in the same culture medium supplement with 1 ng/ml murine IL-3. Human keratinocytes were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany) and maintained in keratinocyte growth medium-2 (PromoCell) following the manufacturer's instructions. Human IL-31 tagged with V5 and poly-histidin

epitope (V5-His) was produced in the laboratory as previously described (16). Human recombinant OSM was purchased from R&D systems (Oxon, UK). The OSMR-Fc, GPL-Fc fusion proteins, monoclonal anti-OSMR (AN-V2) and IgG1 isotype control antibodies were produced in the laboratory. A polyclonal anti-GPL antibody (T3C15) was raised by immunizing rabbits with a 15-mer peptide chosen in the AB loop of the receptor as previously described (8). Polyclonal antibodies directed against phospho-STAT1 (tyr701), phospho-STAT3 (tyr705), phospho-MAPK (thr202/tyr204) and MAPK were bought from Upstate Technology (Lake Placid, NY). Polyclonal anti-STAT3 and anti-STAT1 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Monoclonal anti-V5 antibodies coupled or not to peroxidase were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). The anti-mouse and anti-rabbit peroxidase labeled antibodies were purchased from Clinisciences (Montrouge, France).

Cloning of the fusion protein OSMR-L-GPL

The linker, corresponding to the short proximal part of the IL6R α extracellular domain (residues Ala³²³-Val³⁶²), was amplified by PCR (26). ClaI and EcoRI sites were introduced in the sense primer and anti-sense primers respectively. The PCR product was cloned into pcDNA3.1/D TOPO V5-His vector. A fragment corresponding to the CBD regions and the Ig-like domain of OSMR (residues Met¹-Ala⁴²⁸) was amplified by PCR. A Hind III and a ClaI restriction sites were introduced in the sense and anti-sense primers respectively. The amplification product was cloned into the pcDNA3.1/D TOPO V5-His plasmid containing the linker. The fragment corresponding to the CBD of GPL (residues Leu²¹-Glu²²⁵) was amplified by PCR and introduced in 3' side of the construct using EcoRI and NotI restriction sites. The construct was verified by DNA sequencing.

Protein expression and purification

The HEK 293 cell line was stably transfected with pcDNA3.1D/TOPO OSMR-L-GPL V5-His using the Exgen transfection reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Cell supernatants were cleared by centrifugation and stored at -20°C. They were submitted to an anion exchange column (Amersham, Biosciences) before an affinity purification step using Ni²⁺-sepharose column chromatography (Amersham,

Biosciences). Purified fractions were dialysed against PBS before being submitted to SDS-PAGE, silver staining and western-blot analyses. Some preliminary experiments were carried out by transient expression of the protein in Cos-M6 cells using the DEAE-dextran method. The chimeric cytokines (OSM-Fc and IL-31-Fc), consisting of the cytokines coupled to the Fc part of human IgG1, were expressed in Cos-M6 cells using the DEAE-dextran transfection method. After a 72 h transfection period, culture media were collected, and the protein was immunopurified on a protein A column.

Endoglycosidase treatment

OSMR-L-GPL was diluted in 1% Brij 96 lysis buffer and treated with 25 units/ml of N-glycosidase-F (Roche, Mannheim, Germany) for 12 h at 37°C before anti-V5 western-blot analyses.

Immunoprecipitation, co-precipitation and western-blot analyses

For immunoprecipitation experiments, samples were incubated overnight at 4°C with indicated antibodies. Complexes were then isolated using beads coupled to protein A and suspended in sample buffer (1% SDS, 1% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 2-β mercapto-ethanol). Samples were then submitted to SDS-PAGE and transferred onto Immobilon membranes. These membranes were subsequently incubated overnight with the primary antibody, before being incubated with the appropriate peroxidase-labeled secondary antibody. The reaction was visualized by chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Les Ulis, France).

For co-precipitation experiments, chimeric cytokines fused with the human immunoglobulin Fc segment were incubated in the presence of indicated soluble receptors overnight at 4°C. Complexes were then isolated using beads coupled to protein A and submitted for western-blot analyses as described above.

Phosphorylation analysis

Cells seeded in 24-well plates were incubated 2 h at 37°C with or without the purified fusion protein and activated for 10 min in the presence of the indicated cytokines. Cells were lysed in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% bromophenol blue), sonicated and then

submitted to western-blot analyses as described above. Membranes were stripped 2 h at room temperature in glycine buffer (0.1 M/pH 2.8) before being re-blotted.

Luciferase reporter gene assay

Cells were transfected, using kit V reagent (Amaya, Gaithersburg, MD), with 2.5 μg of the SIEM-Luc reporter gene. This construct contains three consensus binding sites located upstream of a thymidine kinase minimal promoter (28). Twenty-four hours after transfection, cells were serum-starved for 6 h and then incubated overnight with either medium alone or with the indicated combinations of cytokines and OSMR-L-GPL. Cells were washed with PBS, and 70 μl of lysis buffer was added to the wells (0.1M KHPO₄, pH 7.8, 0.1% Triton X-100) before adding luciferine. The luciferase activity was measured using a Packard Topcount luminometer (Meriden, CT).

Quantitative-PCR

Total RNAs were extracted using the RNeasy micro kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Then, RNAs were reversed transcribed into cDNA using random hexamer primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Primers were designed using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>). PCR amplification reactions were carried out in duplicate with iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) in a 15μl-reaction volume containing 200 nM primers and 5 ng cDNA, and using a Chromo4™ System (Bio-Rad). Thermal cycling was initiated with a 3 min incubation at 95°C followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 55 °C for 15 s and 72°C for 15s. The ΔCt method was retained for quantification, and the GAPDH gene was used for normalization as described previously (29).

Proliferation assays

The Ba/F3 stably expressing OSM receptor and IL-31 receptor chains (gp130, OSMRβ and GPL chains) and Go-G-UVM cell lines were seeded in 96-well plates at a concentration of 5 .10³ cells/well in RPMI 5% fetal calf serum or 1.5 .10³ cells/well in RPMI 1% fetal calf serum, respectively. Serial dilutions of tested cytokines and fusion protein were performed in triplicate. After a 72 h incubation period, 0.5 μCi of ³H

thymidine (Amersham, Les Ullis, France) was added to each well for the last 4 hours of the culture and the incorporated radioactivity measured by scintillation counting (Packard Top count luminometer, Meriden, CT).

RESULTS

Design and engineering of the fusion protein OSMR-L-GPL

The fusion protein, OSMR-L-GPL, was designed to contain the minimal domains of OSMR and GPL required for high affinity IL-31 binding (Figure 1A). The OSMR segment corresponding to the CBDs and the Ig-like domain, was placed at the N-terminus side of the construct. It included the OSMR signal peptide to facilitate the secretion of the fusion protein. The GPL fragment corresponding only to the CBD was linked at the C-terminus of the OSMR construction. In between both receptor parts, a short flexible peptide corresponding to the membrane proximal part of IL-6R α extracellular domain was added. A similar linker was previously used because its flexibility allowed the fusion protein to adopt an appropriate conformation, and also for its weak immunogenicity (26). V5 and His tag epitopes were added at the C-terminus of the OSMR-L-GPL fusion protein, to facilitate affinity purification and western blot detection. The resulting chimeric protein OSMR-L-GPL consists of 720 amino acids (Figure 1B).

Expression and characterization of OSMR-L-GPL

To produce the fusion protein, the cDNA encoding for OSMR-L-GPL was stably transfected in the HEK 293 cell line. Culture supernatants were submitted to a concentration step by an anion exchange column. OSMR-L-GPL was purified on a Ni column. The fractions obtained after elution were then submitted to SDS-PAGE before silver staining and western-blotting analyses. The soluble polypeptide displays a molecular weight of 150 kDa corresponding to a mature protein of 145 kDa after subtracting molecular weight tags (Figure 2A).

To further characterize the fusion protein, we performed immuno-precipitation experiments using a monoclonal antibody directed against the extracellular part of OSMR (anti-OSMR, AN-V2) followed by immuno-revelation using an

antibody specifically recognizing GPL (anti-GPL, T3C15). A signal corresponding to the expected molecular weight of OSMR-L-GPL was detected after an immuno-revelation using the antibody directed against GPL (Figure 2B). This result showed that OSMR and GPL domains were correctly encoded from the OSMR-L-GPL plasmid.

Deglycosylation experiments were then carried out using N-glycosidase-F to remove N-linked polysaccharides from the protein backbone. A 25 kDa molecular weight shift (150 kDa versus 125 kDa) was observed (Figure 2C). This result was in agreement with the predicted occupancy of the N-glycosylation sites, using the NetNGlyc 1.0 Prediction site, which predicted 10 sites of N-glycosylation.

IL-31 directly contacts OSMR-L-GPL

To analyze the ability and the specificity of the fusion protein to bind IL-31, immuno-precipitation experiments were carried out. IL-31 fused to a Fc fragment, IL-31-Fc, was added to OSMR-L-GPL. Since OSMR is a shared receptor subunit for both IL-31 and OSM, a putative association of OSM to the OSMR portion of the fusion protein was also studied by adding OSM-Fc to OSMR-L-GPL. Contact of IL-31 to the fusion protein was readily demonstrated after precipitation and western-blotting analysis (Figure 3). Under the same conditions, no association between OSM and OSMR-L-GPL could be shown, emphasizing the specificity of OSMR-L-GPL for IL-31. These results are in agreement with previous studies demonstrating a direct association of OSM to gp130 but not to OSMR alone (10, 30, 31).

As IL-31 bound OSMR-L-GPL, we next analyzed the ability of the fusion protein to antagonize functional activities of IL-31.

OSMR-L-GPL neutralizes IL-31 signaling

We previously reported that interaction of IL-31 with its membrane complex receptor on the glioblastoma cell line Go-G-UVM induced the recruitment of the following signaling pathways: Jak1, Jak2, STAT1,-3,-5, Pi3 kinase/AKT and MAP kinase (16). We therefore studied the ability of OSMR-L-GPL to neutralize the biological activity of IL-31. To this end, we measured the phosphorylation level of STAT1, STAT3, and MAPK in Go-G-UVM in response to IL-31 or IL-31 plus OSMR-L-GPL. Addition of 50 ng/ml IL-31 or OSM induced a robust tyrosine phosphorylation of studied signaling

proteins (Figure 4A, lanes 2 and 3). Activation of the STATs and the MAP kinases induced by IL-31 were entirely abrogated when the fusion protein OSMR-L-GPL was added (Figure 4A, lanes 3 and 5). As expected, OSM induced phosphorylation of the signaling molecules even in the presence of the soluble chimeric receptor (lanes 2 and 4). These findings indicate that OSMR-L-GPL was able to specifically antagonize IL-31 activity in signaling experiments.

The effect of OSMR-L-GPL on STAT3 transcriptional activity in response to IL-31 was analyzed in the same cell line (Figure 4B). Go-G-UVM cells were transfected with a reporter construct containing three STAT3 consensus binding sites located upstream of a thymidine kinase minimal promoter (28). After a 48h culture period, cells were stimulated for an additional 16 h with IL-31, OSM and the fusion protein. Luciferase transcription, which was induced by both cytokines, was specifically neutralized when IL-31 was added to the cells in combination with OSMR-L-GPL.

We subsequently performed a dose response analysis of OSMR-L-GPL using the same cells. Several cytokine/fusion protein ratios were tested, as indicated in figure 4C. Interestingly, an equimolar ratio of IL-31 and OSMR-L-GPL was sufficient to fully neutralize IL-31 activity. As expected, OSMR-L-GPL failed to block OSM activity.

OSMR-L-GPL is a potent IL-31 antagonist in cell proliferation assays

We then studied the ability of the fusion protein to antagonize IL-31 in a proliferation assay using the murine Ba/F3 cell line transfected with gp130, OSMR and GPL. This cell line proliferates in response to IL-31 or OSM (16). Increasing concentrations of OSMR-L-GPL were added to fixed amounts of IL-31 or OSM (2.2 ng/ml and 0.2 ng/ml respectively, corresponding to concentrations leading to a 50% of maximum signal in the assay), and then a tritiated thymidine incorporation was carried out. OSMR-L-GPL neutralized the activity of IL-31 in a dose-dependent manner. Half inhibition was observed for a concentration of 100 ng/ml corresponding to an 8-fold molar excess fusion protein compared to IL-31 (figure 5). In contrast, OSMR-L-GPL had no significant effect on OSM-induced cell proliferation, underlining the specificity of the response to IL-31.

OSMR-L-GPL suppresses gene induction and cell differentiation upon stimulation with IL-31

A second functional assay was developed to assess the specificity of the OSMR-L-GPL neutralizing effect. This functional assay was based on the cytostatic activity of OSM towards tumoral cell lines (32,33). Similarly to OSM, we observed that addition of IL-31 to glioblastoma-derived cell lines led to an inhibition of cell proliferation and an accumulation of the cells in the Go phase (C. Diveu, unpublished observation). IL-31 addition to the Go-G-UVM culture led to a profound inhibition of cell proliferation that was reversed in the presence of OSMR-L-GPL (Figure 6). Similar to that observed in the above experiments, the fusion protein failed to neutralize OSM activity in the Go-G-UVM cells. In addition to their anti-proliferative effects, OSM and IL-31 also induced morphological modifications of the studied cell line. In the absence of cytokines, Go-G-UVM cells presented an elongated appearance with cytoplasmic extensions and inter-cellular contacts. After a 5-day cytokine exposure, Go-G-UVM cells underwent morphological changes and became rounder and the cellular extensions wore off. Addition of the fusion protein to the cultures prevented the morphological changes observed in the presence of IL-31 (Figure 6B).

We then studied some of the proinflammatory genes induced by IL-31. These genes have been identified from a screening array experiment (L. Preisser, unpublished data) and we tested the ability of OSMR-L-GPL to modulate their expressions in response to IL-31 or OSM in the Go-G-UVM cells (Figure 7). Interestingly, the proinflammatory gene signature (IL-6, OSMR, VEGF-A, CXCL16) was induced by both OSM and IL-31. Thus, the OSMR-L-GPL fusion protein specifically reversed the IL-31 effect on gene transcription.

Neutralization of IL-31 activity by OSMR-L-GPL in human epidermal keratinocytes

We recently reported that OSM is a potent keratinocyte activator and plays an important role in cutaneous inflammatory responses (34). Moreover, IL-31 induced release of chemokines by human epidermal keratinocytes, and after IL-31 intradermal injection, a neutrophil infiltration as well as a thickening of epidermis were observed (1). Given these observations, we studied the neutralizing potential of OSMR-L-

GPL in primary cultures of human keratinocytes. Both IL-31 and OSM induced STAT-3 recruitment. However, the fusion protein inhibited STAT-3 phosphorylation induced by IL-31, but not by OSM (Figure 8).

DISCUSSION

Recent studies indicate that IL-31 is a key trigger of atopic dermatitis and possibly other allergic diseases such as asthma (1-5). An agent that neutralizes IL-31 may have a therapeutic role in these diseases.

In the present study, we developed an approach to neutralize IL-31 by fusing the extracellular portions of its two receptor chains. The first five extracellular modules of OSM receptor, composed of a half CBD followed by an Ig-like domain and a second complete CBD, were associated to GPL/IL-31R CBD. We had previously observed that the CBD of GPL was involved in direct binding of IL-31, through a site II motif (Diveu C. *et al.* in preparation and 16). Conversely, IL-31 interaction with the OSMR chain was based on contact between the site III of the cytokine and the Ig-like domain of OSMR (24).

Obtained results indicate that OSMR-L-GPL is a potent inhibitor for IL-31 functional responses. The amount of IL-31 required to obtain a half-maximal response in an *in vitro* assay is usually of 5 to 10 pM (1,16). Here, we show that a 1-10-fold molar excess of OSMR-GPL is sufficient to fully neutralize IL-31 responses in different assays. This finding suggests that the affinity of the fusion protein for its ligand is in the 100 pM range. This result needs to be further assessed in additional binding studies by measuring the affinity of IL-31 for its antagonist.

OSMR is also engaged in the formation of a second cytokine receptor by heterodimerizing with gp130 in the presence of OSM (9,10). We previously reported that OSM first binds to the CBD of gp130 (site II) and then to the Ig-like domain of OSMR (site III) (31,35). OSM displays numerous functional properties, such as cytostatic activities towards solid tumor-derived cell lines, proliferation as well as activation of endothelial cells, induction of acute phase protein synthesis by liver and induction of pro-inflammatory responses in *in vivo* models. Strikingly, inactivation of OSMR in the mouse led to a nearly normal phenotype with only a slight decrease in platelet number (36),

suggesting that this pathway is more likely recruited in pathological situations rather than in healthy animals. In the present work, we particularly focused on the functional properties of OSMR-L-GPL using human cells that were sensitive to both IL-31 and OSM. This focus allowed us to precisely determine the specificity of the developed fusion protein. In all tested systems OSMR-L-GPL only neutralizes IL-31 without affecting its neighboring cytokine, OSM.

IL-31 and OSM belong to a larger family of cytokines that encompasses IL-6, IL-11, CNTF, cardiotrophin-1, cardiotrophin-like cytokine, neuropoietin, LIF and IL-27 (37). These cytokines contact their receptors through different binding sites referred to as sites I, II and III. These mediators can be subdivided in two subgroups: those recruiting three receptor components via sites I, II and III, and a second subgroup (IL-31, OSM, LIF), requiring the involvement of only two receptor subunits recognized through interactions with the site II and III. A recent report described the possibility of neutralizing the LIF response by using a mouse construction inhibiting interactions between the receptor subunits and site II and III of the cytokine (38). Our findings extend this approach to the human IL-31 receptor and emphasizes the specificity of the observed neutralizing response.

Interestingly, we also found that IL-31 displays cytostatic activity towards glioblastoma cell lines, similar to OSM. IL-31 inhibits the proliferation of these cells, induces morphological modifications (cells became rounder and lost their cytoplasmic extensions), and increases the transcription of proinflammatory genes. Interestingly, OSMR-L-GPL also reversed these properties of IL-31 on glioblastoma-derived cells.

Up to now the main functional activities or deleterious activities of IL-31 were observed in skin models and skin pathologies (1,2,4). Overexpression of IL-31 or its subcutaneous injection in mice led to increased scratching behavior and a development of severe dermatitis. In line with these observations, IL-31 was increased in an animal model of atopic dermatitis (NC/Nga mice) and in patients suffering from atopic dermatitis (3-5). Recently, an IL-31 single nucleotide polymorphism was associated with this pathology (39). Here, we show that OSMR-L-GPL was also able to

neutralize IL-31 mediated signaling in primary cultures of human keratinocytes.

Additional work will be required to develop a murine IL-31 antagonist based on a similar approach and to validate its ability to neutralize

IL-31 in animal models of skin diseases. The present work and further studies will contribute to the design of new approaches to treat cutaneous pathologies.

REFERENCES

1. Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., Bort, S., Mudri, S., Kuijper, J. L., Bukowski, T., Shea, P., Dong, D. L., Dasovich, M., Grant, F. J., Lockwood, L., Levin, S. D., LeCiel, C., Waggle, K., Day, H., Topouzis, S., Kramer, J., Kuestner, R., Chen, Z., Foster, D., Parrish-Novak, J., and Gross, J. A. (2004) *Nature immunology* **5**(7), 752-760
2. Takaoka, A., Arai, I., Sugimoto, M., Yamaguchi, A., Tanaka, M., and Nakaike, S. (2005) *European journal of pharmacology* **516**(2), 180-181
3. Bilsborough, J., Leung, D. Y., Maurer, M., Howell, M., Boguniewicz, M., Yao, L., Storey, H., LeCiel, C., Harder, B., and Gross, J. A. (2006) *The Journal of allergy and clinical immunology* **117**(2), 418-425
4. Takaoka, A., Arai, I., Sugimoto, M., Honma, Y., Futaki, N., Nakamura, A., and Nakaike, S. (2006) *Experimental dermatology* **15**(3), 161-167
5. Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A. I., Pivarcsi, A., Soto, H., Kemeny, L., Alenius, H., Dieu-Nosjean, M. C., Meller, S., Rieker, J., Steinhoff, M., Hoffmann, T. K., Ruzicka, T., Zlotnik, A., and Homey, B. (2006) *The Journal of allergy and clinical immunology* **117**(2), 411-417
6. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) *The Biochemical journal* **374**(Pt 1), 1-20
7. Ghilardi, N., Li, J., Hongo, J. A., Yi, S., Gurney, A., and de Sauvage, F. J. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(19), 16831-16836
8. Diveu, C., Lelievre, E., Perret, D., Lak-Hal, A. H., Froger, J., Guillet, C., Chevalier, S., Rousseau, F., Wesa, A., Preisser, L., Chabbert, M., Gauchat, J. F., Galy, A., Gascan, H., and Morel, A. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(50), 49850-49859
9. Thoma, B., Bird, T. A., Friend, D. J., Gearing, D. P., and Dower, S. K. (1994) *The Journal of biological chemistry* **269**(8), 6215-6222
10. Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S., and Cosman, D. (1996) *The Journal of biological chemistry* **271**(51), 32635-32643
11. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990) *Cell* **63**(6), 1149-1157

12. Bravo, J., and Heath, J. K. (2000) *The EMBO journal* **19**(11), 2399-2411
13. Gearing, D. P., Thut, C. J., VandeBos, T., Gimpel, S. D., Delaney, P. B., King, J., Price, V., Cosman, D., and Beckmann, M. P. (1991) *The EMBO journal* **10**(10), 2839-2848
14. Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., and et al. (1992) *Science (New York, N.Y)* **255**(5050), 1434-1437
15. Dreuw, A., Radtke, S., Pflanz, S., Lippok, B. E., Heinrich, P. C., and Hermanns, H. M. (2004) *The Journal of biological chemistry* **279**(34), 36112-36120
16. Diveu, C., Lak-Hal, A. H., Froger, J., Ravon, E., Grimaud, L., Barbier, F., Hermann, J., Gascan, H., and Chevalier, S. (2004) *European cytokine network* **15**(4), 291-302
17. Chattopadhyay, S., Tracy, E., Liang, P., Robledo, O., Rose-John, S., and Baumann, H. (2007) *The Journal of biological chemistry* **282**(5), 3014-3026
18. Leung, D. Y., and Bieber, T. (2003) *Lancet* **361**(9352), 151-160
19. Neis, M. M., Peters, B., Dreuw, A., Wenzel, J., Bieber, T., Mauch, C., Krieg, T., Stanzel, S., Heinrich, P. C., Merk, H. F., Bosio, A., Baron, J. M., and Hermanns, H. M. (2006) *The Journal of allergy and clinical immunology* **118**(4), 930-937
20. Davis, S., Aldrich, T. H., Ip, N., Stahl, N., Scherer, S., Farrugella, T., DiStefano, P.S., Curtis, R., Panayotatos N., Gascan, H., Chevalier, S., and Yancopoulos, G. D. (1993) *Science (New York, N.Y)* **259** (5102), 1736-1739
21. Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T., and Kishimoto, T. (1992) *J Immunol* **148**(7), 2175-2180
22. Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G. D., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993) *Blood* **82**(4), 1120-1126
23. Sporeno, E., Paonessa, G., Salvati, A. L., Graziani, R., Delmastro, P., Ciliberto, G., and Toniatti, C. (1994) *The Journal of biological chemistry* **269**(15), 10991-10995
24. Diveu, C., Venereau, E., Froger, J., Ravon, E., Grimaud, L., Rousseau, F., Chevalier, S., and Gascan, H. (2006) *The Journal of biological chemistry* **281**(48), 36673-36682
25. Economides, A. N., Carpenter, L. R., Rudge, J. S., Wong, V., Koehler-Stec, E. M., Hartnett, C., Pyles, E. A., Xu, X., Daly, T. J., Young, M. R., Fandl, J. P., Lee, F., Carver, S., McNay, J., Bailey, K., Ramakanth, S., Hutabarat, R., Huang, T. T., Radziejewski, C., Yancopoulos, G. D., and Stahl, N. (2003) *Nature medicine* **9**(1), 47-52
26. Ancey, C., Kuster, A., Haan, S., Herrmann, A., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(19), 16968-16972

27. Renne, C., Kallen, K. J., Mullberg, J., Jostock, T., Grotzinger, J., and Rose-John, S. (1998) *The Journal of biological chemistry* **273**(42), 27213-27219
28. Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., Froger, J., Guillet, C., Elson, G. C., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2001) *The Journal of biological chemistry* **276**(25), 22476-22484
29. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002) *Genome biology* **3**(7), RESEARCH0034
30. Liu, J., Modrell, B., Aruffo, A., Marken, J. S., Taga, T., Yasukawa, K., Murakami, M., Kishimoto, T., and Shoyab, M. (1992) *The Journal of biological chemistry* **267**(24), 16763-16766
31. Olivier, C., Auguste, P., Chabbert, M., Lelievre, E., Chevalier, S., and Gascan, H. (2000) *The Journal of biological chemistry* **275**(8), 5648-5656
32. Zarling, J. M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M. B., Lioubin, M. N., and Todaro, G. J. (1986) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**(24), 9739-9743
33. Grant, S. L., and Begley, C. G. (1999) *Molecular medicine today* **5**(9), 406-412
34. Boniface, K., Diveu, C., Morel, F., Pedretti, N., Froger, J., Ravon, E., Garcia, M., Venereau, E., Preisser, L., Guignouard, E., Guillet, G., Dagregorio, G., Pene, J., Moles, J. P., Yssel, H., Chevalier, S., Bernard, F. X., Gascan, H., and Lecron, J. C. (2007) *J Immunol* **178**(7), 4615-4622
35. Plun-Favreau, H., Perret, D., Diveu, C., Froger, J., Chevalier, S., Lelievre, E., Gascan, H., and Chabbert, M. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(29), 27169-27179
36. Tanaka, M., Hirabayashi, Y., Sekiguchi, T., Inoue, T., Katsuki, M., and Miyajima, A. (2003) *Blood* **102**(9), 3154-3162
37. Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2004) *Growth factors (Chur, Switzerland)* **22**(2), 75-77
38. Metz, S., Naeth, G., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (2008) *The Journal of biological chemistry* **283**(10), 5985-5995
39. Schulz, F., Marenholz, I., Folster-Holst, R., Chen, C., Sternjak, A., Baumgrass, R., Esparza-Gordillo, J., Gruber, C., Nickel, R., Schreiber, S., Stoll, M., Kurek, M., Ruschendorf, F., Hubner, N., Wahn, U., and Lee, Y. A. (2007) *The Journal of allergy and clinical immunology* **120**(5), 1097-1102

FOOTNOTES

We thank Catherine Guillet for her careful reviewing of the manuscript. We also thank David Perret for his initial technical advice. E.V. was supported by grants from the Ministère de la Recherche and

Fondation pour la Recherche Médicale, C.D. was supported by grants from Angers Agglomération and the Société Française d'Hématologie. This study was supported by Grant 5176 from the Association pour la Recherche contre le Cancer and by the CIMATH Program of the Région Pays de la Loire.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic presentations of the IL-31 receptor and of the OSMR-L-GPL fusion protein. **A.** Schematic representations of the modular structure of IL-31 receptor components: OSMR and GPL, and of the fusion protein OSMR-L-GPL. The fusion protein contained the CBDs and the Ig-like domain of OSMR bound to the CBD of GPL. The linker consisted of a short flexible fragment of the extracellular proximal part of the IL-6R α chain. CBD, Cytokine Binding Domain; Ig-like, Immunoglobulin like; Fn III, Fibronectin III. **B.** Schematic representation of the fusion protein OSMR-L-GPL. Numbers refer to the amino acid positions in the fusion protein. SP, Signal Peptide.

Figure 2. Detection and biochemical analysis of OSMR-L-GPL. **A.** OSMR-L-GPL purified from a Ni⁺ agarose column was analysed by SDS-PAGE. The gel was silver stained and western-blotting analysis performed using a monoclonal anti-V5 tag antibody. WB, Western-Blot. **B-C.** Cos-M6 cells were transfected with the mock vector or the vector-encoding OSMR-L-GPL. **B.** Cell supernatants were immunoprecipitated with an isotype control monoclonal antibody (IgG1, 5 μ g/ml) or with a monoclonal anti-OSMR antibody (AN-V2, 5 μ g/ml). Immunorevelation was performed using an anti-GPL polyclonal antibody (T3C15, 1 μ g/ml). IP, immunoprecipitation; WB, Western-blot. **C.** Cell supernatants were treated for 12 h at 37°C in the presence or not of 1 unit of N-glycosidase-F (N-glyco-F). Immunorevelation was performed using the monoclonal anti-V5 tag antibody.

Figure 3. Binding analysis of OSMR-L-GPL. Cytokines fused to the IgG1 Fc fragment (50 ng/ml) were incubated in the presence of 600 ng/ml OSMR-L-GPL for 16 h at 4°C before a pull-down with protein A beads. The IL-31/OSMR-L-GPL association was detected using a monoclonal anti-V5 antibody coupled to peroxidase. An anti-IgG1 polyclonal antibody coupled to peroxidase was used to control the cytokines-Fc loading. IP, Immunoprecipitation; WB, Western-Blot.

Figure 4. OSMR-L-GPL neutralized IL-31 signaling. **A.** 50 ng/ml of OSM or IL-31 were pre-incubated with 600 ng/ml purified OSMR-L-GPL, or with an equivalent volume of PBS, for 2 h at 37°C. Mixed reagents were added to the Go-G-UVM glioblastoma cell line for 10 min at 37°C. The STAT-1, STAT-3 and MAPK phosphorylation levels were determined by western-blot analyses using antibodies directed against the active forms of signaling proteins. The blots were stripped and then reblotted with the appropriate antibody recognizing all protein forms. STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase. **B.** Go-G-UVM cells were transfected with a SIEM-Luc construct in order to analyze STAT3 transcriptional activity in response to studied cytokines. 100 ng/ml of OSM or IL-31 were mixed with a 10-fold molar excess OSMR-L-GPL or with an equivalent volume of PBS as control. After a 2 h incubation, the proteins were added to Go-G-UVM cells for a 12 h culture period at 37°C. The STAT3 activation level was measured by using a Packard Topcount luminometer (Meriden, CT). **C.** Following a contact of 50 ng/ml OSM or IL-31 with increasing concentrations of purified OSMR-L-GPL (21, 43, 85 and 171 ng/ml) for 2 h at 37°C, the Go-G-UVM cell line was activated for 10 min at 37°C. The STAT-3 tyrosine phosphorylation levels were determined by western-blot analysis. The blot was then stripped and restained with an antibody recognizing both activated and non-activated forms of STAT-3.

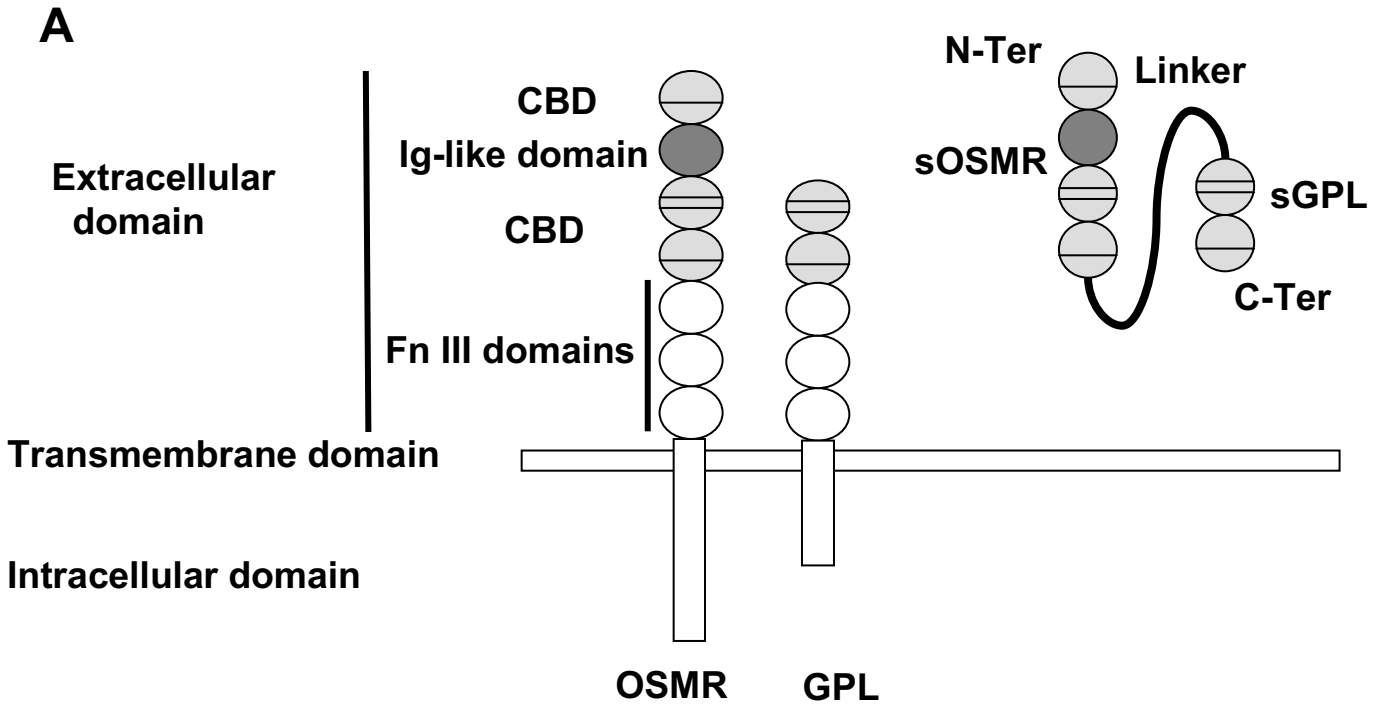
Figure 5. OSMR-L-GPL neutralized the IL-31-induced proliferation of Ba/F3 cells. Ba/F3 cells stably transfected with OSM and IL-31 receptor components were cultured in triplicate with 2-fold dilutions of purified OSMR-L-GPL, or an equivalent volume of PBS, and fixed amounts of OSM (0.2 ng/ml) or IL-31 (2.2 ng/ml). After a 48h culture period a ³H thymidine pulse was carried out for 4 hours, and amount of incorporated radioactivity was determined.

Figure 6. OSMR-L-GPL reversed cell differentiation and cytostatic effects of IL-31. **A.** Go-G-UVM cells were cultured in triplicates with 2-fold dilutions of purified OSMR-L-GPL or with an equivalent volume of PBS, and with IL-31 or OSM at a concentration of 15 ng/ml. After a 5-day culture period a ³H thymidine pulse was carried out and the incorporated radioactivity determined. **B.** Phase contrast micrographs of Go-G-UVM cells after a 5-day culture period in the presence of purified OSMR-L-GPL or PBS, and with or without 15 ng/ml of indicated cytokines.

Figure 7. Reverse effects of OSMR-L-GPL on IL-31 induced gene transcription. 50 ng/ml OSM or IL-31 were mixed with 600 ng/ml purified OSMR-L-GPL or with an equivalent volume of PBS. After a 2 h contact at 37°C, proteins were added to Go-G-UVM cell cultures for 6 h. After RNA extraction and cDNA synthesis, quantitative RT-PCR analyses of IL-6, OSMR, VEGF-A, CXCL-16 and SOCS3 gene expression were carried out.

Figure 8. OSMR-L-GPL neutralized IL-31 activation in human epidermal keratinocytes. 50 ng/ml OSM or IL-31 were mixed with 600 ng/ml purified OSMR-L-GPL or with an equivalent volume of PBS for 2 h at 37°C, before being added to primary cultures of human keratinocytes for 10 min at 37°C. Phospho-STAT-3 and STAT-3 protein levels were measured by western-blot analyses.

Figure 1



B

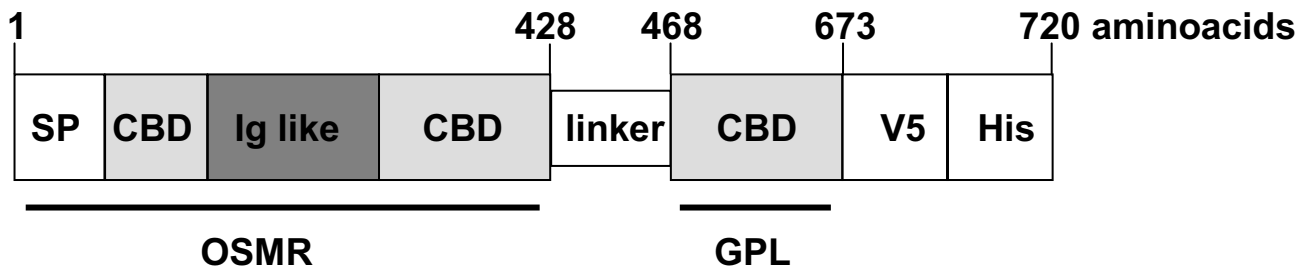


Figure 2

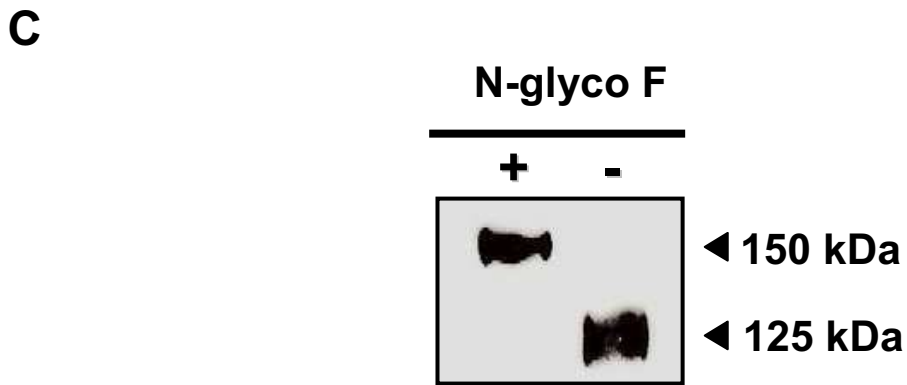
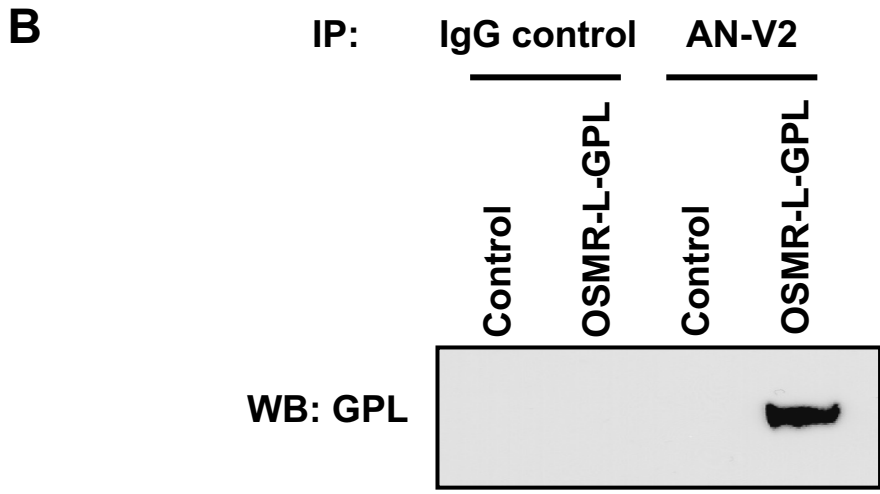
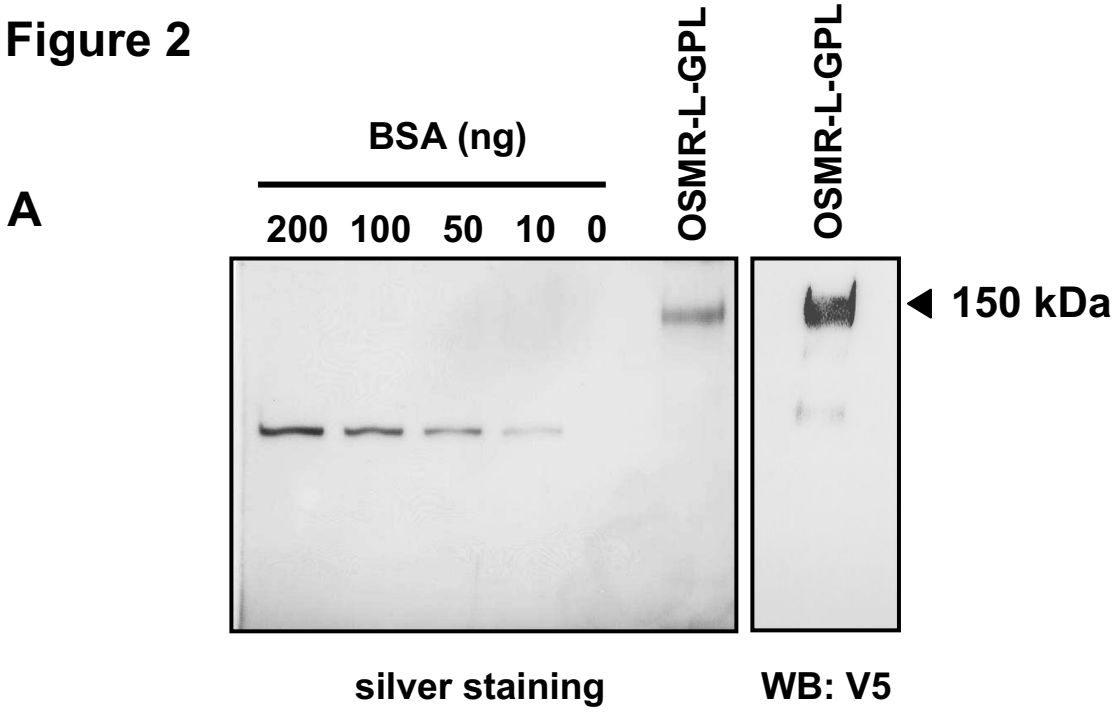


Figure 3

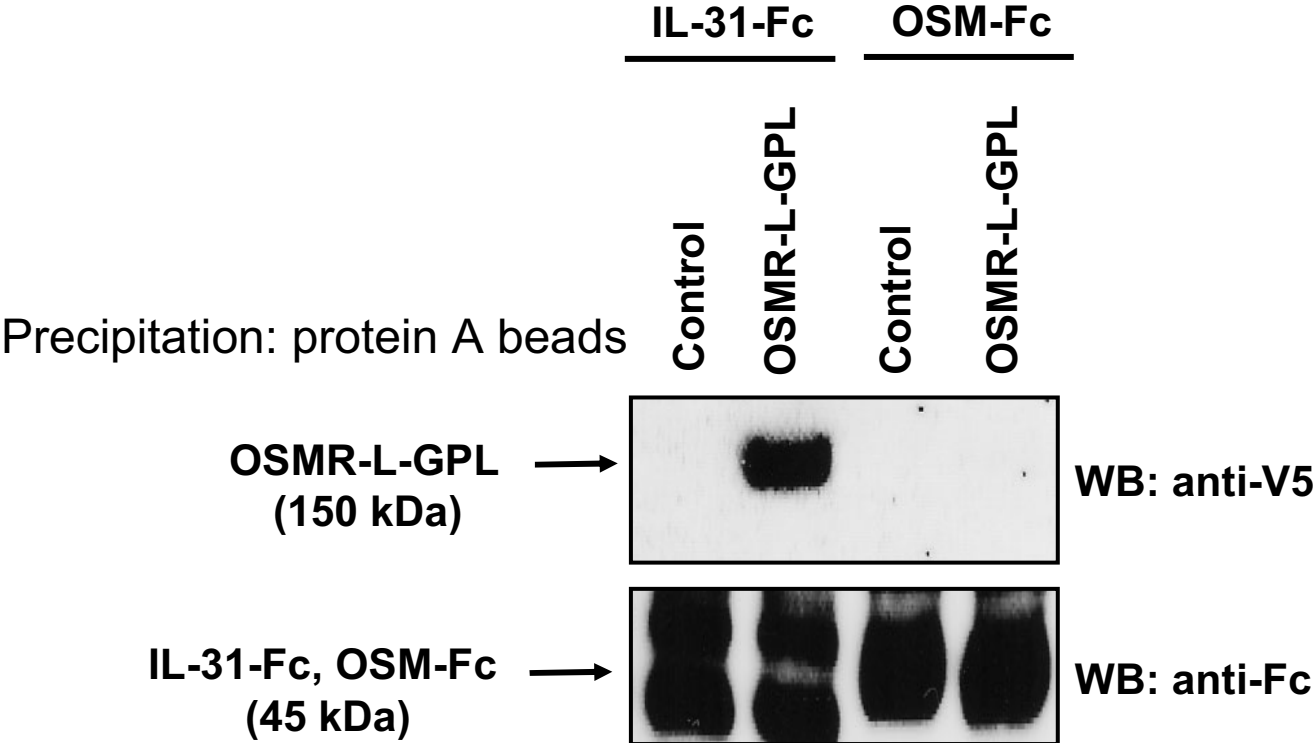


Figure 4

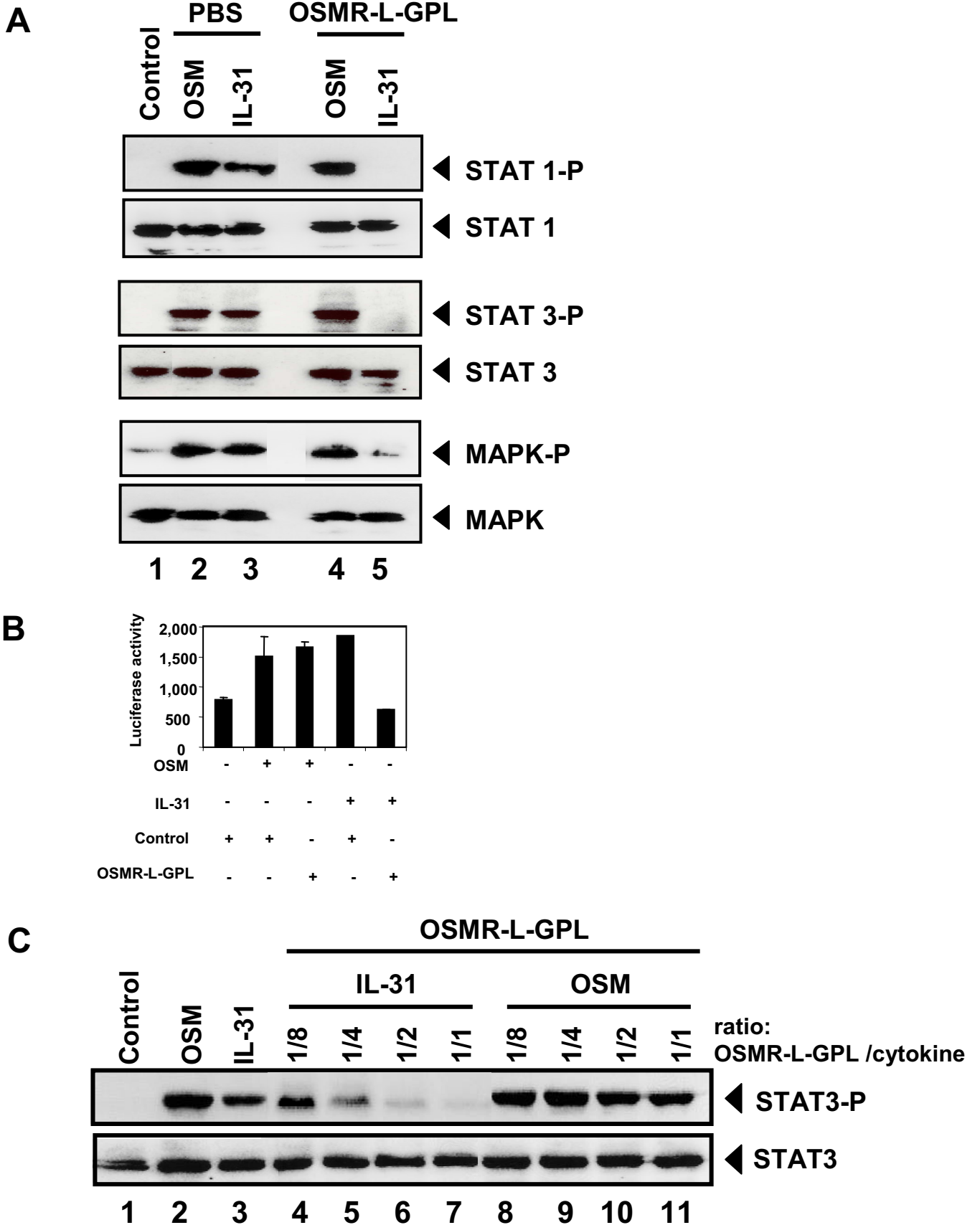


Figure 5

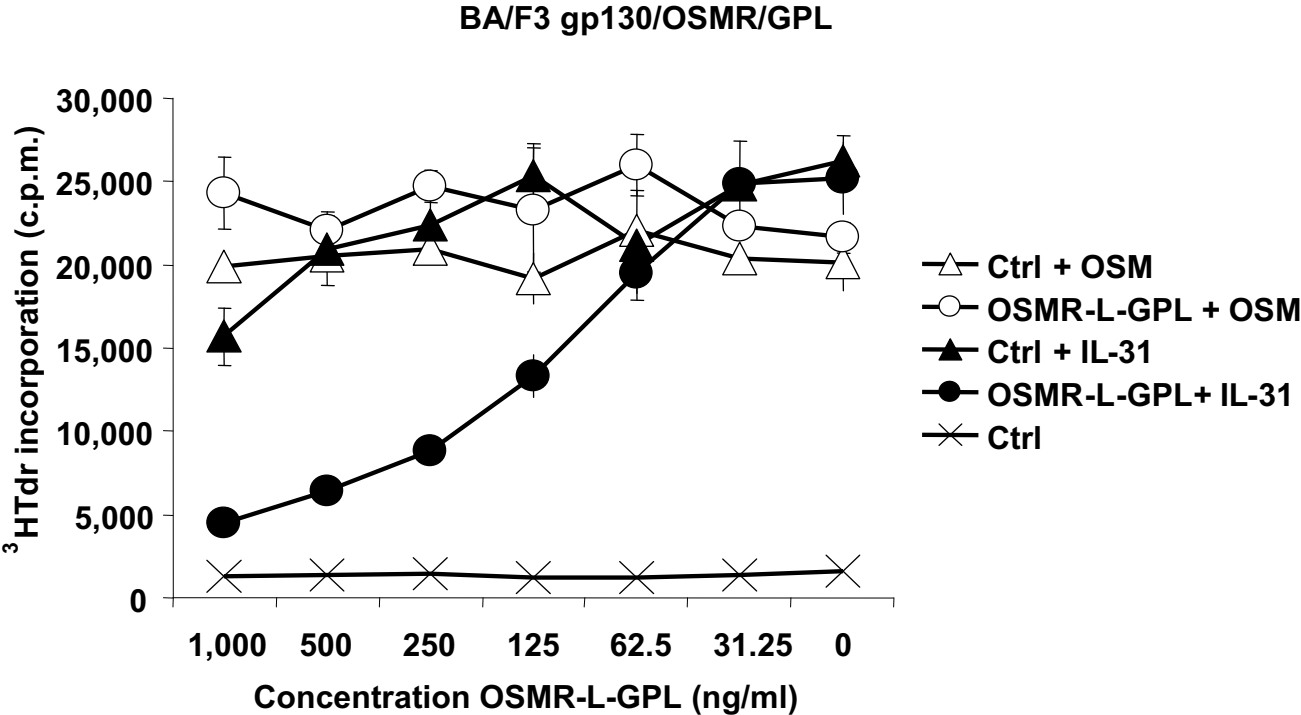


Figure 6

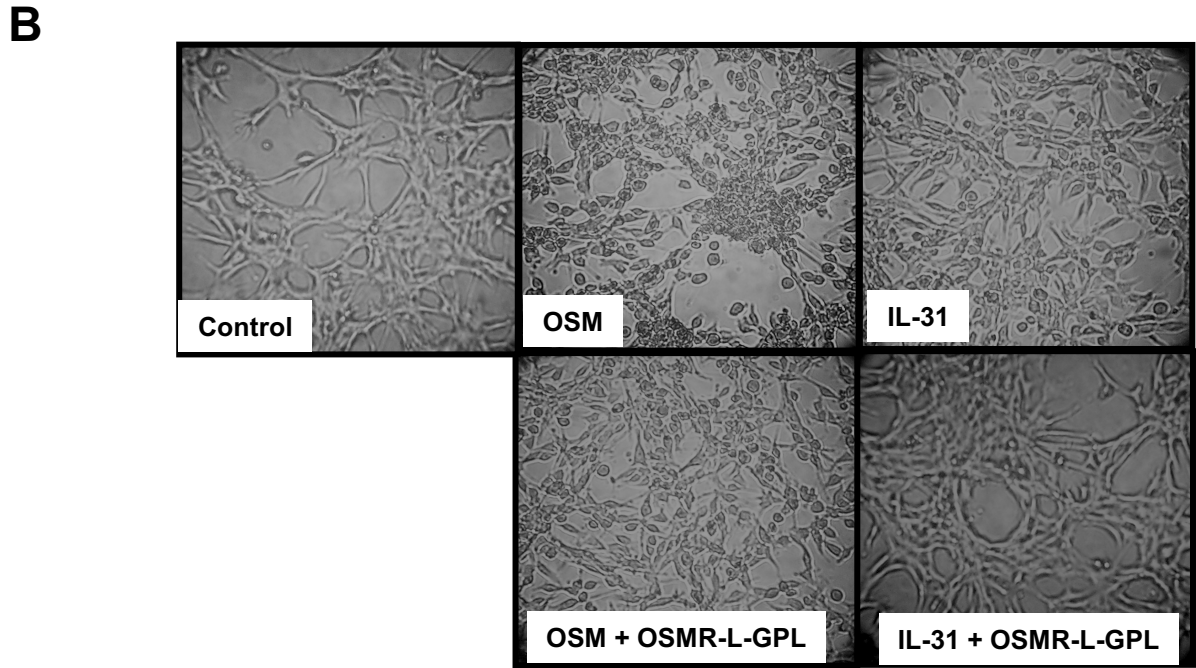
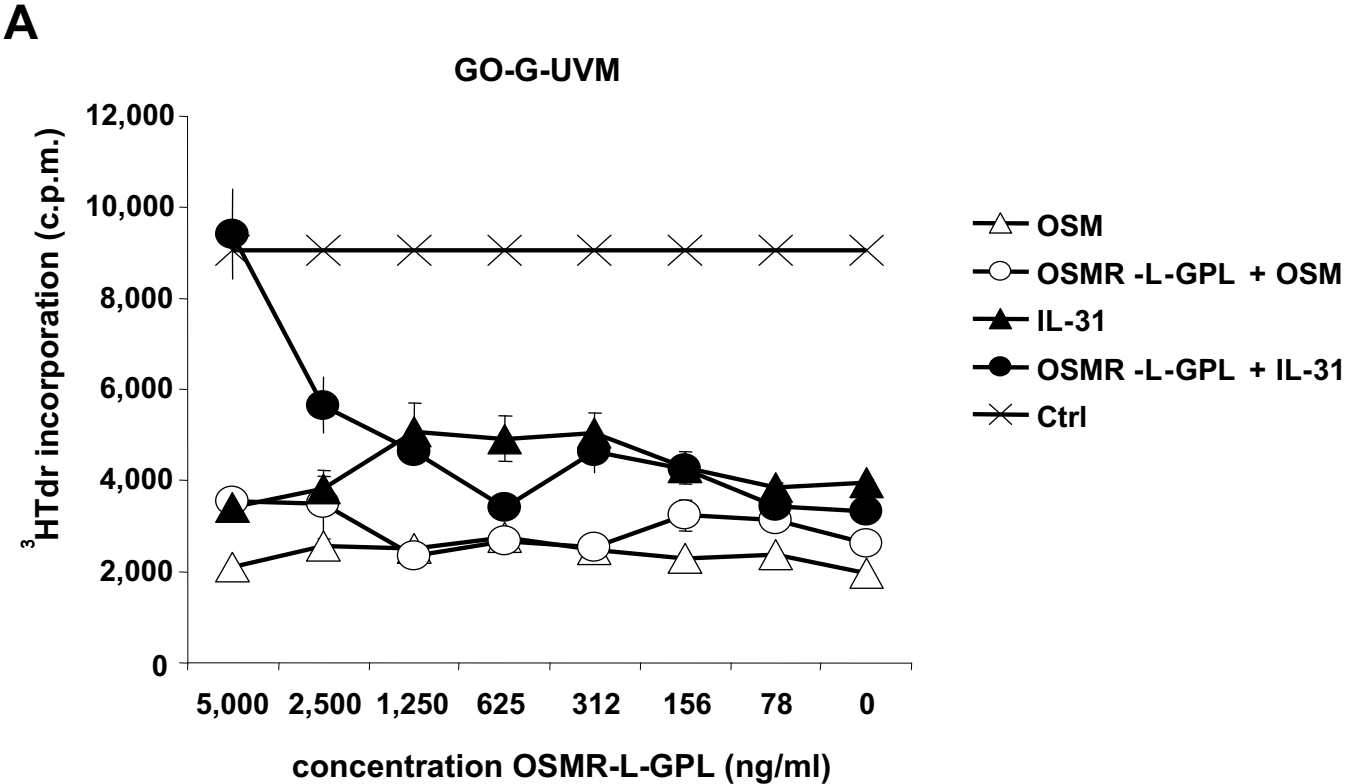


Figure 7

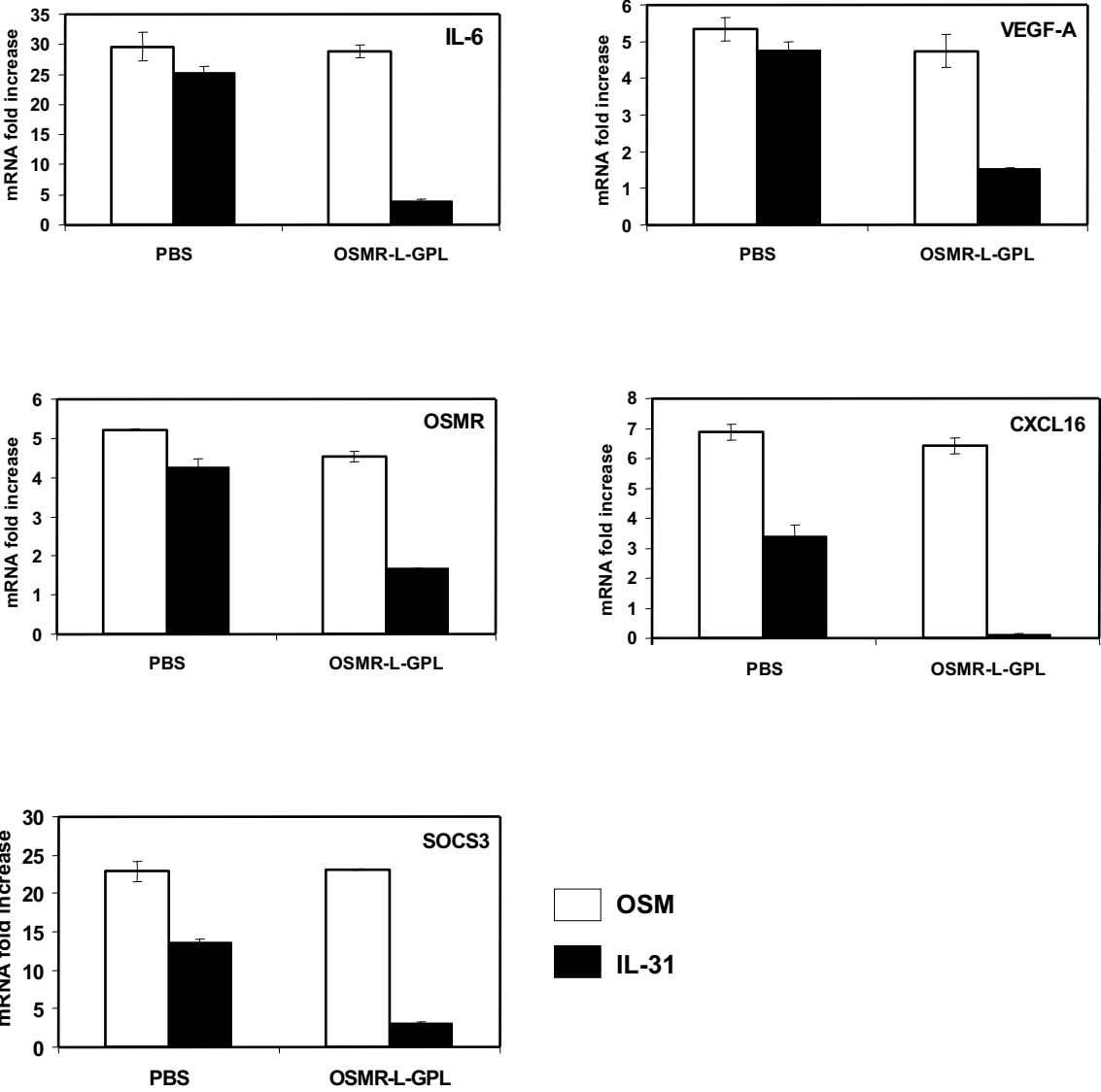
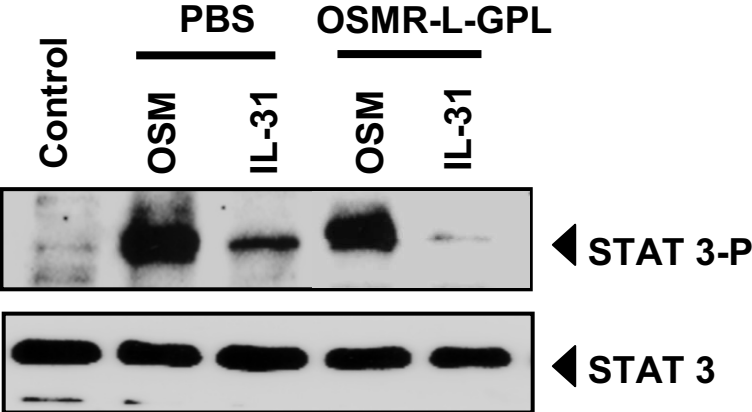


Figure 8



Article 3

Molecular cloning and characterization of rat interleukin-31

Venereau E., Ravon E., Grimaud L., Barbier F., Rousseau F., Preisser L., Moreau MF.,
Chappard D. and Gascan H.

Manuscrit en préparation

1. Identification et clonage de l'IL-31 de rat

Les séquences de l'IL-31 ont été identifiées dans différentes espèces telles que la souris ou l'homme. En se basant sur l'identification de ces protéines, nous avons réalisé un alignement multiple entre ces séquences et le génome de rat (Figure 1). Nous avons ainsi prédit une séquence codant pour l'IL-31 chez le rat. Par des analyses bioinformatiques, nous avons également déterminé la localisation du peptide signal et des quatre hélices α . Afin d'étudier la conservation de l'IL-31 entre les espèces, nous avons calculé le pourcentage d'identité entre les différentes séquences. Ainsi, nous avons observé que cette protéine n'est pas très conservée entre les espèces puisque les taux d'identité sont de l'ordre de 20 à 30% sauf entre le rat et la souris où ce taux a été estimé à 64%.

Afin d'étudier la distribution tissulaire de l'IL-31 chez le rat, nous avons construit une banque d'ADNc de tissus. Nous avons ensuite réalisé des PCR quantitatives à partir de cette banque. L'expression de l'IL-31 n'est pas ubiquitaire, elle est restreinte à quelques tissus tels que le cerveau, le cervelet, la rate, les intestins, les ganglions inguinaux, le thymus, le colon et la vessie. De façon similaire à l'homme, l'expression d'IL-31 la plus élevée chez le rat est observée dans les testicules. Nous avons donc cloné la cytokine à partir de ce tissu grâce à des amorces déterminées à partir de la séquence prédite par les données bioinformatiques. Nous avons cloné la séquence codant pour l'IL-31 dans un vecteur d'expression permettant d'ajouter deux étiquettes (V5 et His) afin de faciliter la détection et la purification de la protéine. Nous avons ensuite produit la cytokine en système eucaryote en transfectant des cellules HEK 293. Après une étape de chromatographie d'échange d'anions, nous avons purifié la protéine par affinité grâce à son étiquette His. Nous avons ensuite réalisé un gel d'argent afin de contrôler la pureté de la protéine produite (Figure 3A). L'IL-31 de rat présente une masse moléculaire apparente de 28kDa. Elle est produite en système eucaryote et par conséquent, elle est glycosylée. La protéine déglycosylée présente une masse moléculaire

apparente de 20kDa (Figure 3B). Ces résultats confirment la prédiction, réalisée à partir du site NetNGlyc 1.0, de trois sites de *N*-glycosylation sur la cytokine.

2. Recherche de cellules cibles pour l'IL-31 de rat

Afin de tester la fonctionnalité de la cytokine, nous avons alors recherché des cellules exprimant le récepteur de l'IL-31 et par conséquent, pouvant représenter des cibles pour cette cytokine. Dans un premier temps, nous avons étudié la distribution tissulaire des deux chaînes réceptrices de l'IL-31 : OSMR et GPL. Cette étude a été réalisée par PCR quantitative sur la banque d'ADNc de tissus préalablement générée (Figure 4). Nous avons ainsi observé une distribution ubiquitaire de la chaîne réceptrice OSMR. Les expressions les plus élevées sont retrouvées dans la rate, les poumons, les ganglions, les plaques de Peyer et la prostate. En ce qui concerne GPL, son expression est plus restreinte et beaucoup moins élevée que celle d'OSMR. En effet, GPL est 20 fois moins exprimé en moyenne. Cependant, une expression élevée de GPL est observée dans la peau, ce qui suggère que cette cytokine présente un tropisme cutané de façon similaire à ses homologues humain et murin.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un criblage par PCR afin de déterminer les lignées cellulaires exprimant le récepteur de l'IL-31 (Figure 5). Nous disposons de lignées cellulaires de rat dérivées de gliomes ou glioblastomes, de lymphomes, d'hépatomes, d'ostéosarcomes ou de carcinomes. De façon similaire à ce que nous avons observé dans les tissus, l'expression de l'OSMR est ubiquitaire contrairement à celle de GPL. En effet, 10 types cellulaires sur 12 expriment l'OSMR alors que seulement deux lignées expriment GPL. La première lignée identifiée, appelée Mat Ly Lu, est dérivée d'un carcinome prostatique. Cette observation concorde avec les résultats de l'étude tissulaire dans laquelle nous avons observé une expression particulièrement élevée de l'OSMR mais également de GPL dans la prostate. Concernant la seconde lignée identifiée, il s'agit de la lignée Walker et dérivée d'un carcinosarcome épithélial mammaire.

Dans une étude précédente, nous avons démontré que l'expression de GPL chez l'homme est modulable, notamment par l'IFN γ . Afin d'augmenter l'expression de GPL et de potentialiser l'activité de l'IL-31, nous avons traité les cellules Mat Ly Lu et Walker avec de l'IFN γ pendant 12 heures. L'expression des deux chaînes réceptrices a été déterminée par PCR quantitative : l'IFN γ induit l'expression de GPL mais également celle de l'OSMR (Figures 6A et 6B).

3. Activités biologiques de l'IL-31 de rat

Dans un premier temps, nous avons étudié les voies de signalisation, activées par l'IL-31, afin de tester la fonctionnalité de la cytokine produite. Dans une étude précédente, nous avons démontré que l'IL-31 induisait l'activation de différentes voies de signalisation : STAT, MAPK et PI3K/Akt. Nous avons donc étudié la phosphorylation de STAT1 et de STAT3 en réponse à l'IL-31 dans la lignée Mat Ly Lu traitée avec de l'IFN γ (Figure 7A et B). Ainsi, l'IL-31 de rat est capable d'induire la phosphorylation de ces facteurs de transcription, et donc de recruter la voie des STATs dans cette lignée. L'OSM murine induit également la phosphorylation de STAT1 et de STAT3. Des résultats similaires ont été observés dans la lignée Walker avec l'activation de STAT3 et des MAPKs en réponse à l'IL-31 de rat et également à l'OSM murine. Cette dernière peut donc agir sur les cellules murines mais également sur les cellules de rat. C'est aussi le cas pour l'OSM humaine qui agit sur les cellules humaines, par l'intermédiaire des récepteurs de type I et II, et sur les cellules murines par l'intermédiaire du récepteur de type I. Cette cytokine n'est donc pas particulièrement spécifique d'espèce. A l'inverse, l'IL-31 murine n'est pas capable de recruter la voie des STATs ou des MAPK dans les cellules de rat. De façon similaire, nous avons déjà observé que la cytokine humaine agit seulement sur les cellules humaines et pas sur les cellules murines, et inversement. Contrairement à l'OSM, l'IL-31 est donc une cytokine présentant une forte spécificité d'espèce. Cette particularité peut s'expliquer en partie par la faible conservation de la séquence protéique entre les espèces, préalablement observée lors des analyses bioinformatiques.

Cette étude nous a permis d'identifier et de cloner l'IL-31 chez le rat. Nous disposons ainsi d'un nouveau modèle d'étude *in vivo* de cette cytokine. De plus, l'analyse de la distribution tissulaire de l'IL-31 et de son récepteur nous laisse penser que cette cytokine présente un tropisme cutané chez le rat, de façon similaire à ses homologues humain et murin.

Molecular cloning and characterization of rat interleukin-31

Venereau E.*, Ravon E.*, Grimaud L.*, Barbier F.*, Rousseau F.*, Preisser L.* Moreau MF.⁺,
Chappard D.⁺ and Gascan H*.

* INSERM U564, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France.

+ INSERM U922, UFR Sciences médicales, rue Haute de Reculee, 49045 Angers Cedex 01,
France.

Interleukin-31 (IL-31) is a recently described T cell derived cytokine, mainly produced by T helper type 2 cells and related to the cytokines of IL-6 family according to its structure and its receptor. Indeed, IL-31 is a four-helix bundle cytokine comprising two long cross-over loops and one short loop. Its heterodimeric receptor is composed of a gp130-like receptor (GPL) associated with an oncostatin M receptor (OSMR). A link between IL-31 and atopic dermatitis was shown by studying the phenotype of IL-31 transgenic mice and IL-31 gene haplotypes in patients suffering from dermatitis. Following the identification of human and murine IL-31, we report in the present work the identification and the molecular cloning of rat IL-31. We identified rat IL-31 predicted sequence by bioinformatic analysis. We have generated rat tissue library in order to study tissue expression of IL-31 and its receptor in rat. Moreover, we studied the biological activities of the purified protein by cell signalling pathways analyses. Rat IL-31 seems to present a skin tropism similarly to its human and murine counterparts.

Running title: molecular cloning of rat interleukin-31.

Keywords: cytokine, IL-31, rat, GPL, OSMR, skin.

Abbreviations: IL, interleukin; OSM, oncostatin M; OSMR, OSM receptor; GPL, gp130-like receptor; STAT, signal transducer and activator of transcription; MAPK, mitogen activated protein kinase.

Introduction

Cytokines comprise a large family of secreted proteins that regulate diverse cellular programs (proliferation, survival and maturation) and are essential for the development and function of the immune, hematopoietic and nervous systems. According to their structure and their receptor, cytokines are classified in several families. Cytokines of the IL-6 family are multifunctional proteins involved in a variety of biological responses, including immune responses, inflammation, neural development and hematopoiesis. This family of cytokines belongs to the long-chain, four helix bundle class and includes IL-6, viral IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), interleukin-11 (IL-11), interleukin-27 (IL-27), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin like cytokine (CLC) and neuropoietin (NP).

Interleukin-31 (IL-31) is a recently identified cytokine related to the cytokines of IL-6 family according to its structure and its receptor (1). Indeed, IL-31 is a four-helix bundle cytokine comprising two long cross-over loops and one short loop. It signals through a heterodimeric receptor composed of gp130-like receptor (GPL)/IL-31RA and oncostatin M receptor (OSMR). GPL was recently cloned as a member of the type I cytokine receptor family and its name reflects its close relationship to gp130, the shared receptor subunit of the IL-6-type cytokines. Both receptor genes are located in tandem on chromosome 5 (2, 3). GPL displays common structural motifs with the family of type I cytokine receptors, *i.e.* the cytokine-binding domain (CBD) with two pairs of conserved cysteine residues and a WSXWS motif in the extracellular region. IL-31 binds GPL before recruiting OSMR to form the high affinity receptor. In the other hand, OSMR can also heterodimerize with gp130, when recruited by OSM, to form a functional type II OSM receptor, whereas type I OSM receptor consists of the low affinity chain LIFR associated with gp130 (4).

First observations reported high expression levels of GPL in tissues involved in reproduction, in the myelo-monocytic lineage, in spleen, thymus, lung, skin and trachea (2, 3). In addition OSMR is also expressed in most of these tissues (4). The binding of IL-31 to its receptor leads to an intracellular activation via recruitment of Jak1, Jak2, STAT-1, STAT-3, STAT-5 signaling pathways, as well as the Pi3-kinase/Akt cascade. SHP-2 and Shc adapter molecules are also recruited and contribute to an increased activation of the MAP kinase pathway in response to IL-31 (5-7).

Dillon et al. (2004) reported that mice treated with intradermal injection of IL-31 or transgenic mice overexpressing IL-31 presented increased scratch behavior and developed severe dermatitis (1). An association of IL-31 with atopic dermatitis was evidenced with the IL-31 transgenic mice phenotype that mimics the human pathology. Moreover, it was underlined that IL-31 is expressed in the skin of an animal model of atopic dermatitis (NC/Nga mice) (8). These mice develop dermatitis when they are raised under conventional conditions, but not so under specific pathogen-free conditions. IL-31 expression is increased before the appearance of dermatitis. This observation suggests that IL-31-induced excessive scratching behavior might be the important factor leading to dermatitis in NC/Nga mice (9).

Sonkoly and his collaborators have evidenced the involvement of IL-31 in atopic skin inflammation (10). IL-31 is significantly overexpressed in pruritic atopic compared with nonpruritic psoriatic skin inflammation. Moreover, atopic individuals have an increased tendency to produce higher levels of IL-31 in response to external trigger factors, which may contribute to the development of pruritus. Circulating CLA⁺ T cells produce IL-31 after activation and CLA⁺ skin-homing T cells located in the epidermis of patients with atopic dermatitis express IL-31 mRNA (11). So, IL-31 might contribute to the development of atopic dermatitis-induced skin inflammation and pruritus.

Following the identification of human and murine IL-31, we report in the present work the identification and the molecular cloning of rat IL-31. We have generated rat tissue library in order to study the tissue distribution of IL-31 and its receptor in rat. Moreover, we studied the biological activities of the purified protein by cell signalling pathways analyses. We also suggest that rat IL-31 presents a skin tropism similarly to its human and murine counterparts.

Materials and methods

Cells and reagents

Cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Rat epidermal keratinocytes were purchased from Cell Applications (San Diego, CA) and were cultured in rat REK growth medium (Cell Applications). Antibody raised against phospho-STAT3, phospho-STAT1 and phospho-MAPK were purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) and anti-STAT3, anti-STAT1 and anti-MAPK antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-V5 antibody was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Anti-mouse and anti-rabbit peroxidase labeled immunoglobulins were from Clinisciences (Montrouge, France). Murine recombinant OSM was purchased from R&D systems (Oxon, UK). Murine recombinant IL-31 was produced in the laboratory.

Gene analysis

The multiple alignment of IL-31 orthologous sequences was made using ClustalW and manually refined. The signal peptide was identified by SignalIP. Determination of the *N*-glycosylation site occupation was carried out using NetNGlyc 1.0 Prediction site. The identity and similarity rates were computed using GeneDoc.

Cloning of rat IL-31

Total RNA from rat testis was extracted by the TRIzol method according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). 2 μ g of testis RNAs were subjected to cDNA synthesis using the superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamer primers (GE Healthcare, Orsay, France). 2 μ L of total cDNA were amplified with the Platinum

Pfx DNA polymerase (Invitrogen) using 10nM of rat IL-31 sense primer (CACCATGATCTTCTACACAGGACCG) and anti-sense primer (TGAGCATATATTGTCTTTAGCCTGCAC). PCR product was cloned into the pcDNA 3.1 D/TOPO V5-His mammalian expression vector (Invitrogen). The integrity of the construct was verified by DNA sequencing using an automatic DNA sequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Construction of a rat tissue library and RT-PCR analyses

Total RNA was extracted from freshly isolated rat tissues by the TRIzol method. cDNA was synthesized from 2µg of total RNA using random hexamer primers and MMLV reverse transcriptase. 2µL of total cDNA were amplified by PCR using the following primers: for GPL (sense primer: CCTGCTGAAAGTAGTTTAGC and anti-sense primer: GATTTCTCCCTTGCTGTACTCTGG), for OSMR (sense primer: TCAAAAGTGCTTGAGGAACC and anti-sense primer: GGATGAACTCTGTGGGTCAG), for IL-31 (sense primer: GCCATCTGCAGCTCCTCCTTTG and anti-sense primer: CTGCCATGCAGTCTGAGAACTTC) and for GAPDH (sense primer: ACCACAGTCCATGCCATCAC and anti-sense primer: TCCACCACCCTGTTGCTGTA).

Protein expression and purification

The HEK 293 cell line was stably transfected with murine or rat IL-31-V5-His pcDNA 3.1 D/TOPO plasmid using the Exgen transfection reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Cell supernatants were cleared by centrifugation and stored at -20°C until used. They were submitted to an anion exchange column (GE Healthcare, Orsay, France) before an affinity purification step using a Ni²⁺ sepharose column for chromatography (GE Healthcare, Orsay,

France). Purified fractions were dialysed against Phosphate Buffer Saline (PBS) and then submitted to SDS/PAGE silver staining and western-blotting analyses.

Phosphorylation and western-blot analyses

Cells were seeded in 24-well plates and were activated for 10 min with indicated cytokines. Cells were lysed in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% bromophenol blue), sonicated and then submitted to SDS-PAGE and transferred onto Immobilon membrane. The membranes were subsequently incubated overnight with the primary antibody, before being incubated with the appropriate peroxidase-labeled secondary antibody for 60 min. The reaction was visualized by chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, Orsay, France). Membranes were stripped overnight at 4°C in glycine buffer (0.1 M/pH 2.8) before being re-blotting.

Rat IL-31 was suspended in sample buffer (1% SDS, 1% glycerol, 0,1% bromophenol blue, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 2-β mercapto-ethanol) and then submitted to western-blotting analyses with anti-V5 antibody as describe above.

Endoglycosidase treatment

Rat IL-31 was diluted in 1% Brij 96 lysis buffer and treated with 25 units/ml of N-glycosidase-F (Roche, Mannheim, Germany) for 12 h at 37°C before anti-V5 western-blot analyses.

Quantitative-PCR

Total RNA was extracted using RNeasy micro kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. RNA was reversed transcribed into cDNA using random hexamers primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primers were designed using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer38www.cgi>). PCR

amplifications reactions were carried out in duplicate with iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a 15 μ l reaction volume containing 200 nM primers and 5 ng cDNA, and using a Chromo4™ System (Bio-Rad). Thermal cycling was initiated with a 3 min incubation at 95°C followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 55 °C for 15 s and 72°C for 15s. For quantification the Δ Ct method was retained, and GAPDH gene used for normalization as described previously (12).

Results

Identification of rat IL-31 sequence and analysis of its tissue distribution by quantitative PCR

A multiple alignment was performed using murine, rabbit and human IL-31 sequences in order to identify rat IL-31 sequence (Figure 1A). The cDNA encoded a 159-amino acid precursor and a predicted mature polypeptide of 135 amino acids containing the four helical bundles. Indeed, the signal peptide, identified by SignalIP, consists of the 23 first aminoacids. Three *N*-glycosylation sites were predicted as potentially occupied in rat IL-31 according to the NetNGlyc 1.0 prediction site. This was confirmed by an enzymatic treatment of the protein as presented below in the report (Figure 2B). Computer analysis revealed that rat IL-31 displays high identity rate with the murine sequence but low identity rates with rabbit and human sequences (Figure 1B).

To study rat IL-31 tissue distribution, we constructed a tissue library. In order to compare rat IL-31 expression in all these tissues, we performed quantitative PCR with IL-31 specific primers. The expression of this cytokine is very restricted to few tissues like brain, cerebellum, spleen, bowel, inguinal ganglion, thymus, colon and bladder (Figure 2). Similarly to the human and murine cytokines, the highest expression of rat IL-31 is observed in testis (1). Thus, we used ADNc from this tissue in order to perform molecular cloning of IL-31.

Cloning and expression of rat IL-31

Bioinformatic analyses allowed identification of rat IL-31 predicted sequence and consequently, we designed primers to amplify rat IL-31 cDNA from this predicted sequence. We amplified cDNA coding for the cytokine from testis cDNA. We cloned the PCR product into the mammalian expression vector pcDNA3.1 TOPO V5-His. This vector allows

mammalian expression of the protein. V5 and His tag epitopes were added at the C-terminus of the protein allowing its affinity purification and western-blotting detection.

To produce the protein, the corresponding cDNA was stably transfected in the HEK 293 cell line. Culture supernatants were collected and cleared by centrifugation before a concentration step by an anion exchange column. Rat IL-31 was affinity purified on a Ni²⁺ column, and purified fractions were then submitted to SDS-PAGE before silver staining and western-blotting analyses. Figure 3A shows that the cytokine displays a molecular weight of 28 kDa corresponding, after subtracting molecular weight tags, to a mature protein of 23 kDa .

Deglycosylation experiments were then carried out using N-glycosidase-F to remove N-linked polysaccharides from the protein backbone. A 8 kDa molecular weight shift (28 kDa versus 20 kDa) was observed (Figure 3B). This result is in agreement with the predicted occupancy of the N-glycosylation sites, using the NetNGlyc 1.0 Prediction site, which predicts 3 sites of N-glycosylation.

Rat IL-31 receptor expression in tissues and cell lines

Similarly to the study of rat IL-31 expression, we performed quantitative PCR using OSMR or GPL specific primers to analyse tissue distribution of IL-31 receptor (Figure 4). Concerning OSMR, its expression is ubiquitous and the highest expressions are observed in spleen, lung, ganglions, Peyer patch and prostate. On the contrary, GPL expression is more restricted and less elevated. Indeed, we evaluated normalized quantity of each receptor chain and we observed that OSMR is on average 20-fold more expressed than GPL in tissues. Highest expressions of GPL are observed in spleen, kidney, ganglions and most of all in skin. This observation suggests that this protein presents a cutaneous tropism in a similar way to its human and murine counterparts.

We next performed a screening by PCR, using specific primers of OSMR or GPL, on rat cell lines available in the laboratory in order to identify some IL-31-sensitive cells (figure 5). Similarly to the tissue distribution, OSMR expression is more ubiquitous compared to GPL expression which is very restricted. Indeed, only two cell lines express GPL while almost all the cells tested express OSMR. The first identified cell line, called Mat Ly Lu, is derived from a prostate carcinoma. This result confirm our observations in tissue distribution. Indeed, we observed expression of both receptor chains in prostate tissue. Concerning the second identified cell line, it is an epithelial mammary carcinosarcoma derived cell line called Walker. We previously reported that GPL/IL-31RA expression was strongly up regulated in the presence of IFN γ leading to increased IL-31 functional responses (2). IFN γ was added for 12h to Mat Ly Lu or Walker cells to increase IL-31 receptor expression. We performed quantitative PCR to determinate IFN γ factor induction on OSMR or GPL expression. As expected, IFN γ treatment strongly increases GPL expression, and also OSMR expression, in the both cell lines (Figures 6A and 6B) .

Rat IL-31 induces cell signalling pathways in Mat Ly Lu and Walker cell lines

We previously reported that interaction of IL-31 with its membrane complex receptor induced the recruitment of the following signaling pathways: Jak1, Jak2, STAT1,-3,-5, Pi3 kinase/AKT and MAP kinase (6). We therefore studied the rat IL-31 biological activities on Mat Ly Lu and Walker cells by measuring the phosphorylation level of this signaling pathways, in particular STAT and MAPK pathways. We analysed STAT1 and STAT3 phosphorylations in response to rat IL-31 but also murine IL-31 (Figures 7A and 7B). As expected, rat IL-31 induces phosphorylation of both transcription factors whereas murine IL-31 has no effect on these signaling pathways. We performed similar experiments in the Walker cell line and we observed the same results concerning STAT3 (Figure 7C). However, this activation is weaker

compared to that observed in Mat Ly Lu cells. Moreover, we also studied MAPK pathway in this cell line and we demonstrated activation of the proteins ERK1/2 by rat IL-31 in these cells (Figure 7D). Similarly to the results obtained in Mat Ly Lu cells, murine IL-31 has no effect on these cell signaling pathways in Walker cells. We also observed that human IL-31 has no effect on rat cells (data not shown) and we previously observed that human cytokine only binds on human cells and not murine cells, and conversely the murine cytokine only acts on murine cells. Thus, this cytokine seems to be very species specific contrary to other cytokines of the IL-6 family.

Discussion

IL-31 is a recently identified molecule related to the cytokines of the IL-6 family. Recent studies indicate that IL-31 is a key trigger of atopic dermatitis and possibly other allergic diseases such as asthma (1, 8-11). Moreover, little is known about this cytokine and its activities, and up to day only murine and human proteins have been cloned and studied in biological experiments.

In the present work, we have identified and cloned the rat form of IL-31. A multiple alignment was performed using murine, rabbit, human and rat genomes in order to identify rat IL-31 sequence. The signal peptide sequence and the four α helix localisation have been determined by bioinformatic analyses. Computer analysis also revealed that rat IL-31 displays the highest identity rate with the murine sequence (64%) and only 30% of identity with the other species analysed. These rates are low in comparison to the same analyses performed with other cytokines of the IL-6 family, like for example the OSM, which shows 48% identity between the human and the murine sequences. These observations indicate that IL-31 seems to be a protein not very conserved. A previous study reports 31% of identity between murine and human IL-31 whereas our analysis shows 26% of identity (1). This difference can be explained by the fact that we performed our analysis from the precursor amino acid sequences, which contains the signal peptide, and not from the predicted mature polypeptides.

We previously reported that the interaction of IL-31 with its membrane complex receptor induces the recruitment of the following signaling pathways: Jak1, Jak2, STAT1,-3,-5, Pi3 kinase/AKT and MAP kinase (6). We identified two cell lines, Mat Ly Lu (mammary carcinoma cell line) and Walker (prostate carcinoma cell line), which express both IL-31 receptor chains and to validate the biological activity of rat IL-31, we studied the cell signalling pathways in these both cell lines. We have demonstrated that rat IL-31 activates

STAT and MAPK pathways in these two cell lines. Interestingly, murine IL-31 fails to recruit these signaling pathways and we also observed that human IL-31 has no effect on rat cells (data not shown). Moreover, we have previously observed that human cytokine only binds on human cells and not murine cells, and conversely the murine cytokine only acts on murine cells. Thus, this cytokine seems to be very species specific contrary to other cytokines of the IL-6 family. Indeed, human OSM can also acts on murine cells and, as we observed in our experiments, murine OSM can activate rat cells. This species specificity of IL-31 can be explained in part by the low conservation of IL-31 sequence between species. Structural analyses will be useful to determine IL-31 models in different species and to better understand this species specificity.

We have constructed a tissue library in order to analyse, by quantitative PCR, the tissue distribution of IL-31 and its receptor in rat. IL-31 expression is very restricted to some tissues, like brain, spleen, bowel, thymus or colon, and the highest expression was observed in testis as described in human. Previous studies report that IL-31 is a cytokine mainly produced by Th2 cells in human and mouse (1, 11). It is noteworthy that this cell type has been linked to various atopic diseases. This characteristic of IL-31 is a first observation which correlate this cytokine with atopic dermatitis. Thus, it will be interesting to investigate which purified cell populations produce this cytokine in rat in order to determine if IL-31 is also mainly produced by Th2 cells in this species.

Next, we determined the expression pattern of both rat OSMR and GPL to help elucidate IL-31 target cell populations. We showed that OSMR expression was more ubiquitous and more elevated compared to GPL expression. Interestingly, we also observed a high level of GPL mRNA in skin as it was previously reported in human and mouse tissues (1, 2). Thus, the tissue distribution of the receptor components is in favor of a skin tropism for rat IL-31.

Up to now, the main functional activities or deleterious activities of IL-31 were observed in skin models and skin pathologies, such as atopic dermatitis (1, 8, 9). Overexpression of IL-31 or its subcutaneous injection led to increased scratch behavior and a development of severe dermatitis. In line with these observations, IL-31 expression was also increased in another animal model of atopic dermatitis (NC/Nga mice) and in patients suffering from this pathology. Recently, an IL-31 single nucleotide polymorphism was also associated to this disease (13). These studies confirm the skin tropism of this cytokine. Nevertheless, we did not observe IL-31 expression in skin. Thus, this cytokine may be produced by infiltrating cells, such as Th2 lymphocytes, and then exhibit its deleterious activities on skin cells.

Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) have already been described as an IL-31 target. Indeed, this cell type express both IL-31 receptor chains and IL-31 activates cell signaling pathways in these cells (Diveu C. *et al.*, in preparation). Moreover, a release of chemotactic factors in response to IL-31 by NHEK was observed and suggests a role of this cytokine in inflammatory cell recruitment (1). Thus, experiments can be performed in rat epidermal keratinocytes in order to determine if these cells express IL-31 receptor chains and it will be very interesting to analyse rat IL-31 biological activities in this model to confirm its skin tropism in rat. Complementary experiments will be necessary to study the activities of IL-31 on keratinocytes and more generally to the skin, in particular *in vivo* studies. This study will help to define new animal models to further analyse IL-31 involvement in skin diseases and potential other biological roles.

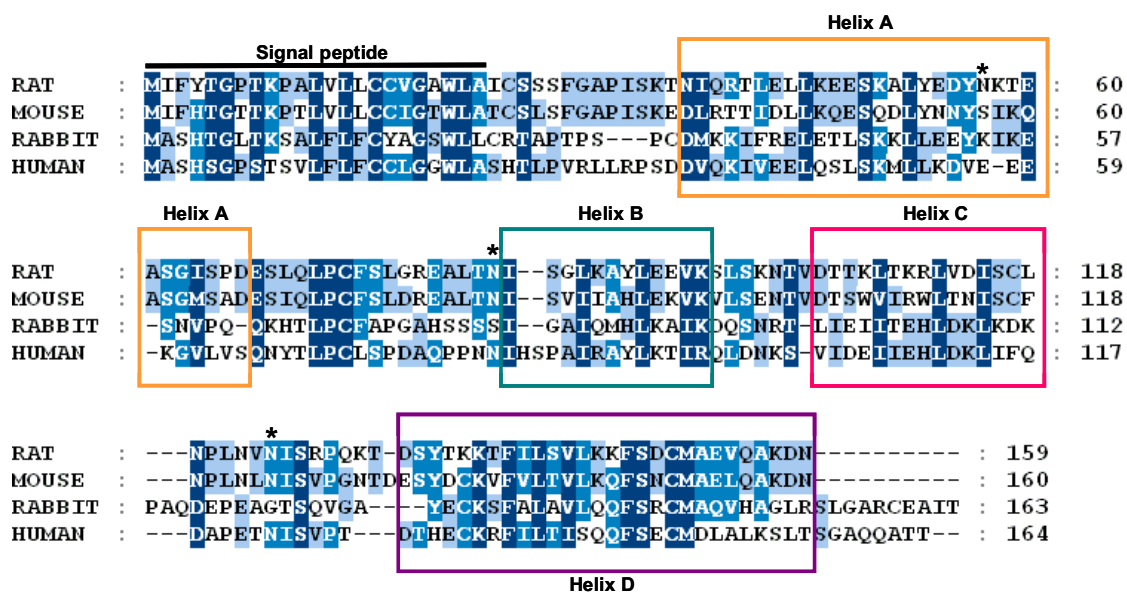
References

1. Dillon, S.R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Billsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S.R. Presnell, H.S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, S. Bort, S. Mudri, J.L. Kuijper, T. Bukowski, P. Shea, D.L. Dong, M. Dasovich, F.J. Grant, L. Lockwood, S.D. Levin, C. LeCiel, K. Waggle, H. Day, S. Topouzis, J. Kramer, R. Kuestner, Z. Chen, D. Foster, J. Parrish-Novak, and J.A. Gross. 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5:752-760.
2. Diveu, C., E. Lelievre, D. Perret, A.H. Lak-Hal, J. Froger, C. Guillet, S. Chevalier, F. Rousseau, A. Wesa, L. Preisser, M. Chabbert, J.F. Gauchat, A. Galy, H. Gascan, and A. Morel. 2003. GPL, a novel cytokine receptor related to GP130 and leukemia inhibitory factor receptor. *J Biol Chem* 278:49850-49859.
3. Ghilardi, N., J. Li, J.A. Hongo, S. Yi, A. Gurney, and F.J. de Sauvage. 2002. A novel type I cytokine receptor is expressed on monocytes, signals proliferation, and activates STAT-3 and STAT-5. *J Biol Chem* 277:16831-16836.
4. Mosley, B., C. De Imus, D. Friend, N. Boiani, B. Thoma, L.S. Park, and D. Cosman. 1996. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 271:32635-32643.
5. Dreuw, A., S. Radtke, S. Pflanz, B.E. Lippok, P.C. Heinrich, and H.M. Hermanns. 2004. Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor. *The Journal of biological chemistry* 279:36112-36120.
6. Diveu, C., A.H. Lak-Hal, J. Froger, E. Ravon, L. Grimaud, F. Barbier, J. Hermann, H. Gascan, and S. Chevalier. 2004. Predominant expression of the long isoform of

- GP130-like (GPL) receptor is required for interleukin-31 signaling. *European cytokine network* 15:291-302.
7. Chattopadhyay, S., E. Tracy, P. Liang, O. Robledo, S. Rose-John, and H. Baumann. 2007. Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 282:3014-3026.
 8. Takaoka, A., I. Arai, M. Sugimoto, A. Yamaguchi, M. Tanaka, and S. Nakaike. 2005. Expression of IL-31 gene transcripts in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *European journal of pharmacology* 516:180-181.
 9. Takaoka, A., I. Arai, M. Sugimoto, Y. Honma, N. Futaki, A. Nakamura, and S. Nakaike. 2006. Involvement of IL-31 on scratching behavior in NC/Nga mice with atopic-like dermatitis. *Experimental dermatology* 15:161-167.
 10. Sonkoly, E., A. Muller, A.I. Lauerma, A. Pivarcsi, H. Soto, L. Kemeny, H. Alenius, M.C. Dieu-Nosjean, S. Meller, J. Rieker, M. Steinhoff, T.K. Hoffmann, T. Ruzicka, A. Zlotnik, and B. Homey. 2006. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 117:411-417.
 11. Billsborough, J., D.Y. Leung, M. Maurer, M. Howell, M. Boguniewicz, L. Yao, H. Storey, C. LeCiel, B. Harder, and J.A. Gross. 2006. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 117:418-425.
 12. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3:RESEARCH0034.

13. Schulz, F., I. Marenholz, R. Folster-Holst, C. Chen, A. Sternjak, R. Baumgrass, J. Esparza-Gordillo, C. Gruber, R. Nickel, S. Schreiber, M. Stoll, M. Kurek, F. Ruschendorf, N. Hubner, U. Wahn, and Y.A. Lee. 2007. A common haplotype of the IL-31 gene influencing gene expression is associated with nonatopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 120:1097-1102.

A



B

Mouse	64		
Rabbit	26	27	
Human	26	26	39
	Rat	Mouse	Rabbit

Figure 1. Identification and organization of rat IL-31 sequence. **A.** Alignment of predicted rat IL-31 sequence with murine, rabbit and human orthologous sequences. The signal peptide and the four helix are indicated on the figure. The alignment was done using ClustalW. *, the position of *N*-glycosylation sites. **B.** Identity rates of IL-31 orthologues are expressed in percentages. Calculations were performed with a multiple sequence alignment built from ClustalW.

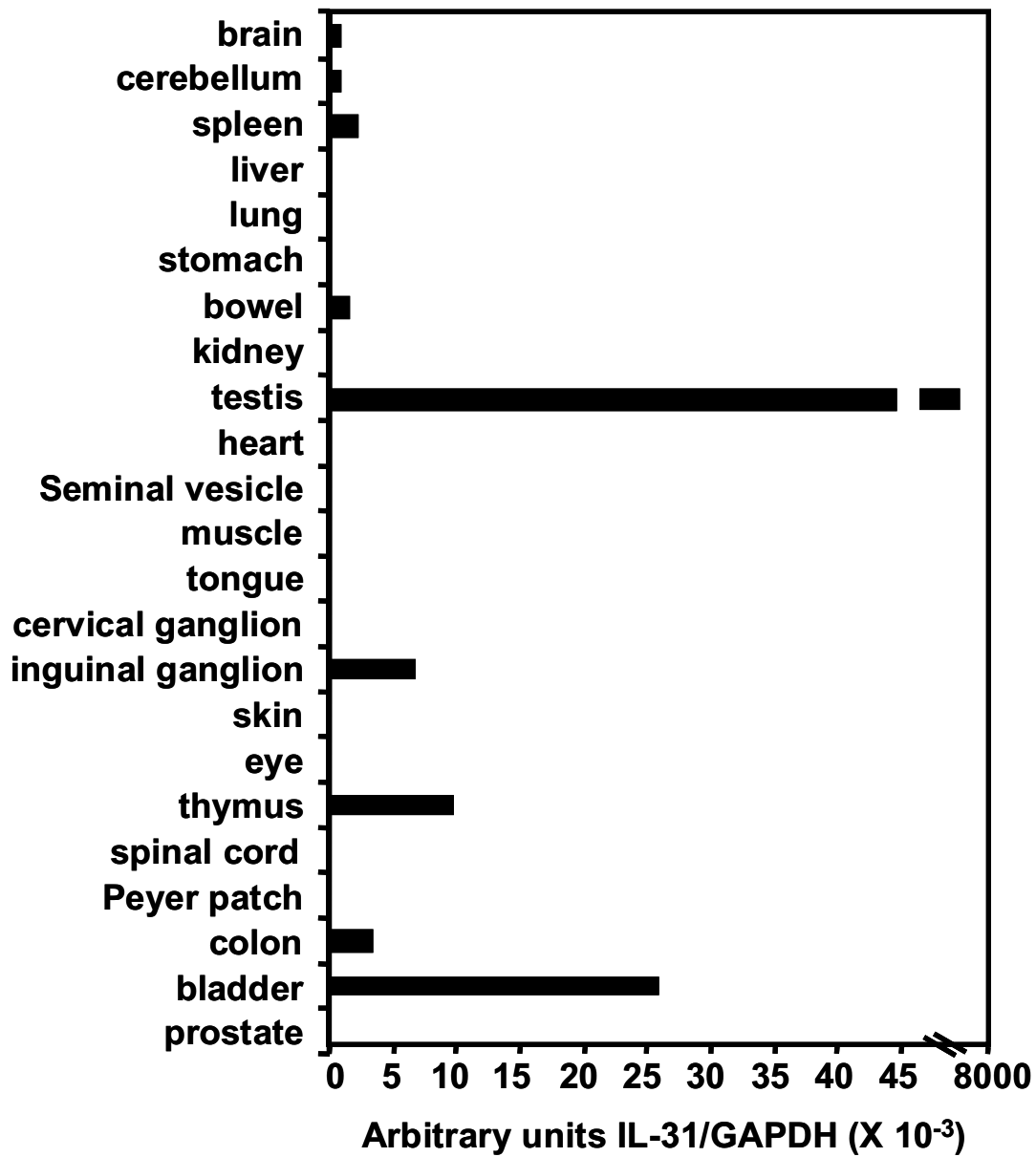
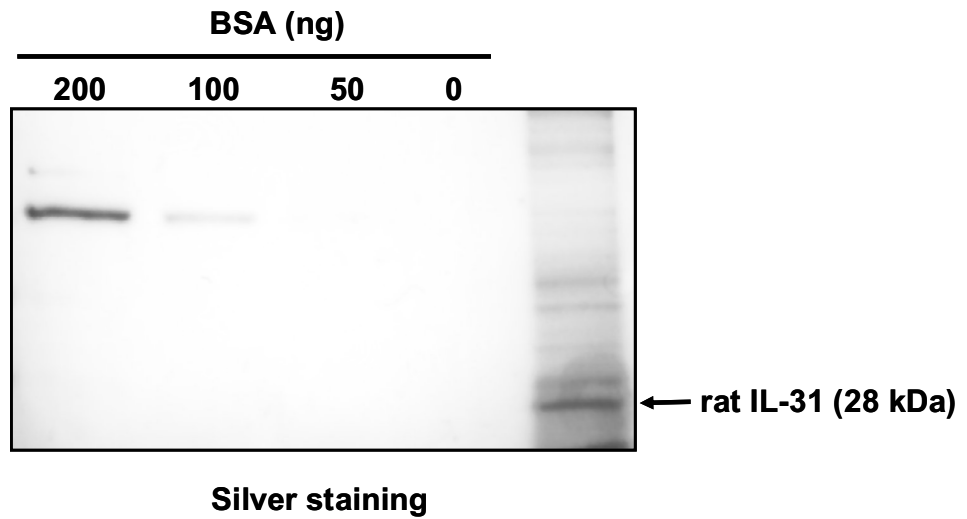


Figure 2. Rat IL-31 tissue distribution analysed by quantitative PCR. Quantitative PCR was performed from rat cDNA tissues library using specific primers for rat IL-31.

A



B



Figure 3. Detection and biochemical analysis of rat IL-31. A. SDS-PAGE analysis of rat IL-31, purified from a Ni²⁺ agarose column, by silver staining. **B.** Rat IL-31 was treated for 12 h at 37°C in the presence or not of 1 unit of N-glycosidase-F. Immunorevelation was performed with the monoclonal anti-V5 tag antibody.

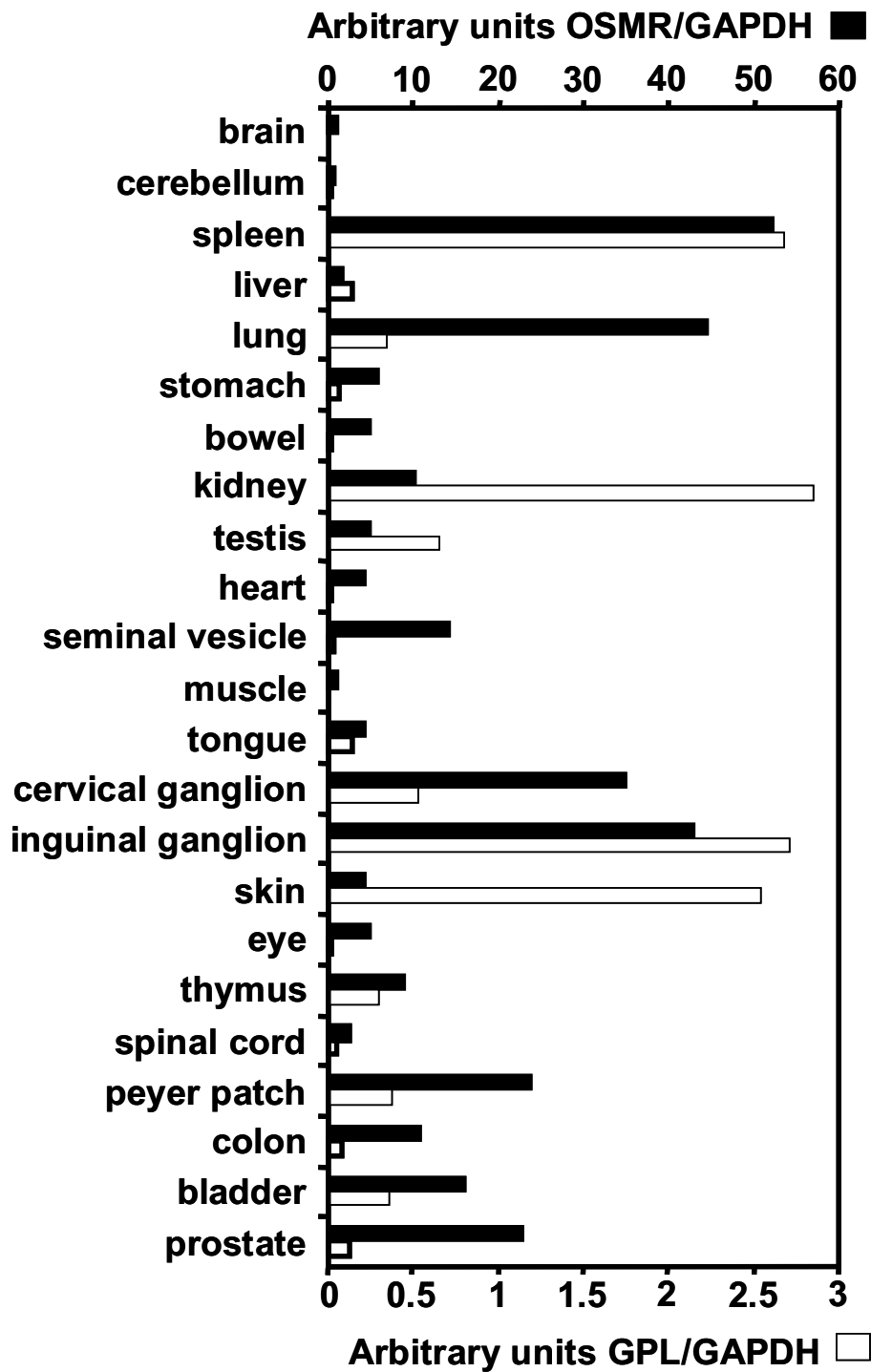
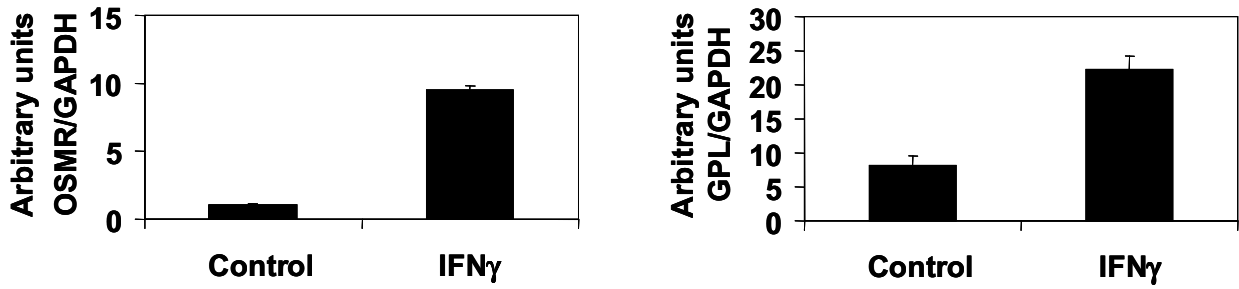


Figure 4. Rat IL-31 receptor tissue distribution analysed by quantitative PCR. Quantitative PCR were performed from rat cDNA tissues library using specific primers to amplify OSMR (*black boxes*) or GPL (*white boxes*) receptor chains.

Name	Cell lines	GPL	OSMRβ
<i>C6</i>	Glioma	-	+
<i>9L</i>	Glioblastoma	-	+
<i>F98</i>	Glioblastoma	-	-
<i>C58</i>	Thymic lymphoma	-	-
<i>OSRGA</i>	Osteosarcoma	-	+
<i>ROS</i>	Osteosarcoma	-	+
<i>UMR-106</i>	Osteosarcoma	-	+
<i>H35</i>	Hepatoma	-	+
<i>PC12</i>	Pheochromocytoma	-	+
<i>Mat Ly Lu</i>	Prostate carcinoma	+	+
<i>Walker</i>	Mammary carcinoma	+	+

Figure 5. Screening of IL-31 receptor expressing cells. PCR were performed using specific primers to amplify OSMR or GPL in cell lines. +: presence of receptor chain, -: absence of receptor chain.

A



B

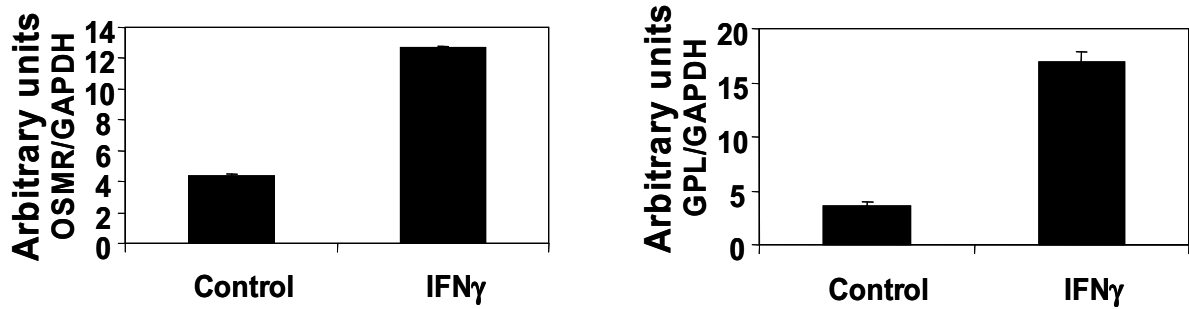


Figure 6. Rat IL-31 receptor expression in Mat Ly Lu and Walker cell lines. A- B. Mat Ly Lu (A) and Walker (B) cell lines were treated 12 h at 37°C with IFN γ . Quantitative PCR were performed from cDNA using specific primers to quantify OSMR or GPL expressions.

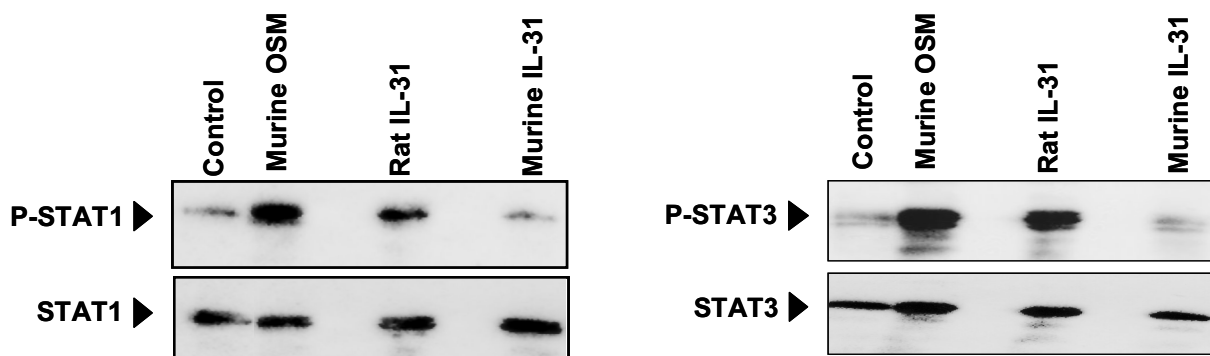
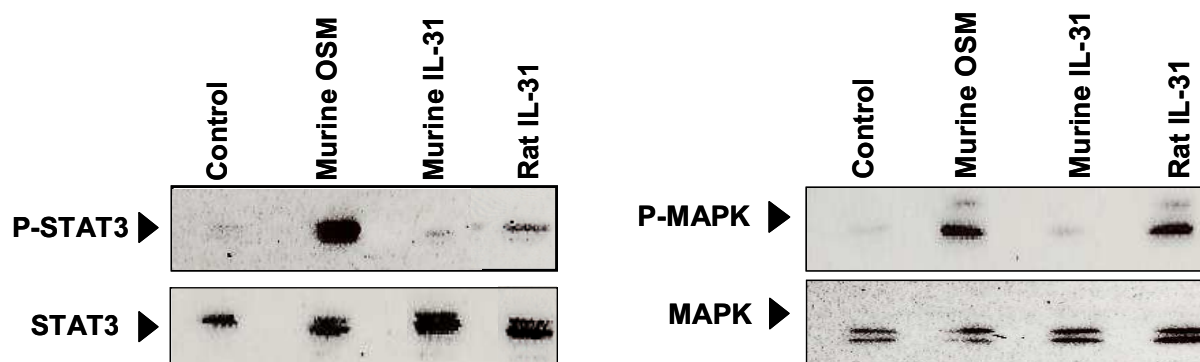
A**B**

Figure 7. Analyses of cell signaling pathways induced by rat IL-31. A. Mat Ly Lu cells were stimulated for 10 min at 37°C by 100 ng/ml of murine OSM or IL-31, or rat IL-31 as indicated on the figure. STAT-1 (*left panel*) and STAT3 (*right panel*) phosphorylation levels were determined by western-blot analysis. **B.** Walker cells were stimulated for 10 min at 37°C by 100 ng/ml of murine OSM or IL-31, or rat IL-31 as indicated on the figure. STAT-3 (*right panel*) and MAPK (*right panel*) phosphorylation level was determined by western-blot analysis using antibodies recognising phosphorylated protein. The blots were stripped and reprobed with an antibody recognising both activated and non-activated signaling proteins (STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase).

Article 4

Activation of Stat4 by OSM and IL-31: critical role in tumoral cell proliferation

Vénéreau E.*, Preisser L.*, Diveu C., Ravon E., Guilleux MH., Chevalier S, Gascan H.

* : Contribution égale

Manuscrit en préparation

Cet article est en cours de rédaction aussi je présenterai uniquement les parties introduction, matériel et méthodes ainsi que les figures légendées.

1. Distribution tissulaire de STAT4

Afin d'étudier la distribution tissulaire de STAT3 et de STAT4, nous avons réalisé une analyse par PCR quantitative sur une banque de tissus humains (Figure 1). Comme cela est décrit dans la littérature, nous avons observé une expression ubiquitaire de STAT3. Cependant, nous avons également observé une expression ubiquitaire de STAT4 contrairement à ce qui est décrit. En effet, l'expression de STAT4 est décrite comme étant restreinte à certains tissus tels que les tissus lymphoïdes et myéloïdes ainsi que les testicules et la rate. Nous avons effectivement observé des quantités élevées d'ARNm dans ces tissus mais l'ensemble des tissus exprime des quantités non négligeables de STAT4. Cette différence entre ce que nous observons et ce qui est décrit dans la littérature peut s'expliquer par la méthode de détection. En effet, nous avons réalisé cette étude par PCR quantitative, une méthode très sensible et reproductible. A l'inverse, les premières études de distribution tissulaire de STAT4 ont été réalisées par northern-blot.

Nous avons observé une expression importante de STAT4 dans le cerveau ce qui nous a amenés à étudier son expression dans des lignées de glioblastomes. Nous avons ainsi mis en évidence son expression dans trois lignées : GO-G-UVM, T98G et U87MG (Figure 2A). Cependant, cette expression n'est pas identique entre les lignées. En effet, la quantité d'ARNm de STAT4 détectée dans la lignée T98G est faible en comparaison des deux autres lignées. En ce qui concerne le niveau d'expression de STAT3, il est équivalent dans les trois lignées analysées mais il est plus élevé que celui de STAT4.

Afin d'identifier des cytokines capables d'activer STAT4 dans ces lignées, nous avons analysé, par PCR quantitative, l'expression de chaînes réceptrices des cytokines des familles

de l'IL-6 et de l'IL-12 (Figure 2B). Nous avons étudié plus particulièrement l'expression des chaînes impliquées dans la transduction du signal c'est-à-dire les chaînes β . Nous avons ainsi observé une absence d'expression des chaînes réceptrices des cytokines de la famille de l'IL-12 : IL-12R β 1, IL-12R β 2 et IL-23R. A l'inverse, les chaînes réceptrices des cytokines de la famille de l'IL-6 (IL-27R, GPL, OSMR, LIFR et gp130) sont exprimées dans les trois lignées.

2. L'OSM et l'IL-31 recrute STAT4 dans des lignées de glioblastomes

Nous avons donc étudié l'activation de STAT4 par l'ensemble des cytokines des familles de l'IL-6 et de l'IL-12 dans des expériences de western-blot (Figure 3). Comme attendu d'après les résultats de PCR quantitative précédents, l'IL-12 et l'IL-23 n'ont pas d'effet sur ces cellules. Une première observation importante est que l'activation de STAT3 est indépendante de celle de STAT4. En effet, certaines cytokines, telles que le LIF, activent STAT3 sans activer STAT4. Nous avons ainsi observé que les principaux activateurs de STAT4 dans la lignée GO-G-UVM sont l'OSM et l'IL-31 (Figure 3A). A l'inverse, l'OSM est la seule cytokine capable d'activer STAT4 dans la lignée T98G (Figure 3B). En ce qui concerne la lignée U87MG, l'OSM est le principal activateur (Figure 3C). Cependant, des expériences d'effet dose d'IL-31 ont montré que cette cytokine est également capable de recruter STAT4 dans la lignée U87MG (données non présentées). Nous avons réalisé des expériences similaires sur la lignée GO-G-UVM (Figure 4A). Nous avons ainsi observé que des concentrations plus élevées d'IL-31 sont nécessaires afin d'obtenir des réponses similaires à celles induites par l'OSM. De même, nous avons réalisé une étude afin d'analyser les cinétiques d'activation de STAT3 et de STAT4 en réponse à l'OSM et à l'IL-31 dans la lignée GO-G-UVM (Figure 4B). Nous avons ainsi mis en évidence que l'activation de STAT4 est plus transitoire que celle de STAT3. En effet, STAT3 est recruté à partir de 5 minutes d'activation jusqu'à deux heures. A l'inverse, STAT4 n'est activée qu'à partir de 10 minutes et le signal commence à s'éteindre à partir de 2 heures d'activation. Une expérience similaire réalisée dans la lignée T98G confirme ces résultats (Figure 3C). En effet, nous avons observé une activation très transitoire de STAT4 en réponse à l'OSM, STAT4 n'étant plus recruté après 30 minutes d'activation en réponse à l'OSM alors que l'activation de STAT3 perdure jusqu'à 2 heures d'activation. L'IL-31 recrute STAT3 mais pas STAT4 dans cette lignée et ces résultats ont été confirmés par des expériences de gènes rapporteurs. En effet, les deux cytokines activent STAT3 dans les lignées GO-G-UVM et T98G (Figure 4C). En ce qui concerne STAT4, l'OSM et l'IL-31 induisent son activation dans la lignée GO-G-UVM alors que seul l'OSM l'active dans la lignée T98G (Figure 4E). Des expériences similaires ont été

réalisées sur la lignée U87MG et elles ont confirmé que l'OSM et l'IL-31 activent STAT3 mais également STAT4 dans cette lignée (données non présentées). L'ensemble de ces résultats démontrent donc pour la première fois que l'OSM et l'IL-31 sont également des activateurs du facteur de transcription STAT4.

3. GPL induit l'activation de STAT3 et de STAT4 par l'intermédiaire de différentes tyrosines cytoplasmiques

Afin d'étudier les tyrosines impliquées dans le recrutement de STAT3 ou de STAT4, nous avons réalisé des expériences à l'aide de récepteurs chimériques. Ces derniers sont constitués des parties extracellulaires des chaînes réceptrices de l'IL-5 associées aux parties intracellulaires, de l'OSMR ou de GPL. Dans un premier temps, nous avons transfecté des cellules Cos7 avec ces récepteurs chimériques afin de vérifier par western-blot que nos constructions étaient fonctionnelles et permettaient le recrutement de STAT3 et de STAT4 en réponse à l'IL-5 (Figure 5A). La présence de récepteurs endogènes, pour l'OSM et l'IL-31, dans les cellules permettent une activation de STAT3 en réponse à l'OSM, et plus faiblement en réponse à l'IL-31. La transfection de GPL potentialise la réponse à l'IL-31. Les hétérodimères chimériques α GPL/ β OSMR et α gp130/ β OSMR, transfectés dans les cellules Cos7, induisent la phosphorylation de STAT3 en réponse à l'IL-5. Des résultats similaires sont observés avec l'activation de STAT4. Nos constructions, ainsi validées, ont été mutées sur différents résidus et nous avons ensuite analysé l'effet de ces mutations sur l'activation de STAT3 ou de STAT4 dans des expériences de gène rapporteur.

Nous avons ainsi réalisé différentes combinaisons de mutations afin de déterminer les tyrosines essentielles à l'activation de STAT3 ou de STAT4. Nous avons muté les tyrosines Y⁹¹⁷ et/ou Y⁹⁴⁵ sur l'OSMR, et les tyrosines Y⁶⁵², Y⁶⁸³ et/ou Y⁷²¹ sur GPL. Ainsi, nous avons démontré que l'activation de STAT3 ou de STAT4 ne nécessitent pas les mêmes tyrosines (Figure 5B). Nous avons transfecté des cellules Cos7 avec les récepteurs chimériques dont les tyrosines ont été mutées ou non. Lorsque seules les deux tyrosines d'OSMR sont mutées, nous observons une inhibition partielle de l'activation de STAT3 ou de STAT4. Des résultats similaires sont observés lorsque seules les tyrosines de GPL sont mutées. L'activation de STAT3 est totalement inhibée lorsque les deux tyrosines (Y⁹¹⁷ et Y⁹⁴⁵) de l'OSMR sont mutées ainsi que les tyrosines 2 et 3 (Y⁶⁸³ et Y⁷²¹) de GPL. Ainsi, l'ensemble de ces tyrosines sont nécessaires à l'activation de STAT3. Ces résultats sont partiellement contradictoires avec une étude réalisée par l'équipe de Peter Heinrich dans laquelle ils ont identifié seulement la tyrosine Y⁷²¹ sur GPL comme principal site impliqué dans l'activation de STAT3 (351).

Cependant, leur modèle est différent puisqu'ils ont étudié un hétérodimère constitué de gp130 et GPL alors que nous avons utilisé un hétérodimère constitué de l'OSMR et de GPL. Concernant l'activation de STAT4 par l'intermédiaire de l'OSMR et de GPL, nous avons mis en évidence qu'elle nécessitait les mêmes tyrosines sur l'OSMR mais seulement la tyrosine 3 (Y⁷²¹) sur GPL. En effet, les mêmes résultats sont observés que les tyrosines 1 et 3 ou 2 et 3 soient mutées. Nous en avons ainsi déduit que seule la tyrosine 3 était essentielle à l'activation de STAT4 et afin de confirmer ces résultats, nous avons généré un récepteur chimérique avec GPL muté uniquement sur la tyrosine (Y⁷²¹) (Figure 5C). Nous avons confirmé que cette mutation sur GPL est suffisante pour inhiber l'activation de STAT4 et nous avons ainsi mis en évidence que GPL induit l'activation de STAT3 et de STAT4 par l'intermédiaire de différentes tyrosines cytoplasmiques. En résumé, les tyrosines 2 et 3 (Y⁶⁸³ et Y⁷²¹) de GPL sont importantes pour le recrutement de STAT3 alors que seule la tyrosine Y⁷²¹ de GPL est nécessaire à l'activation de STAT4.

4. L'OSM et l'IL-31 induisent un effet cytostatique sur les lignées de glioblastome : implication de la voie STAT4

Nous avons ensuite étudié les activités de l'OSM et de l'IL-31 sur les lignées de glioblastomes (GO-GUVM, U87MG et T98G). Nous avons d'abord observé que ces deux cytokines induisent des modifications morphologiques sur les lignées GO-G-UVM et U87MG (Figure 6A). Les cellules s'arrondissent et perdent leurs extensions cellulaires. A l'inverse, nous n'avons pas observé de tels résultats sur la lignée T98G. De plus, ces cytokines exercent un effet cytostatique sur ces lignées comme le montre le test de prolifération de la figure 6B. L'OSM et l'IL-31 inhibent la prolifération naturelle des lignées GO-G-UVM et U87MG. En ce qui concerne la lignée T98G, seule l'OSM inhibe la prolifération de ces cellules. Nous avons aussi observé une forte corrélation entre l'activation de STAT4 et l'effet cytostatique induit par les cytokines. En effet, l'OSM et l'IL-31 induisent l'activation de STAT4 et une inhibition de la prolifération dans les lignées GO-G-UVM et U87MG. L'OSM induit l'activation de STAT4 et exerce un effet cytostatique sur les cellules T98G alors que l'IL-31, qui ne recrute pas STAT4 dans cette lignée, est également incapable d'inhiber la prolifération de ces cellules. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'expression des chaînes réceptrices d'une part et de STAT4 d'autre part (Figures 2A et 2B). En effet, des niveaux d'expression de GPL et de STAT4 identiques sont observés dans les lignées GO-G-UVM et U87MG. En revanche, ces deux transcrits sont plus faiblement exprimés dans la lignée T98G. De plus, nous n'observons pas de corrélation entre l'activation de STAT3 et l'inhibition de

prolifération. En effet, le LIF, qui recrute fortement STAT3 dans ces trois lignées, n'inhibe pas la prolifération de ces cellules (données non présentées). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'activation de STAT4 pourrait être impliquée dans les effets cytotostatiques induits par l'OSM et l'IL-31.

Nous avons reclone STAT4 afin de le transfecter dans les cellules GO-G-UVM. Nous avons ensuite vérifié son expression par PCR quantitative (Figure 7A) et par western-blot (Figure 7B). L'expression de STAT4 est beaucoup plus faible que celle de STAT3 dans les cellules sauvages. Après transfection, les cellules expriment un taux très élevé de STAT4 qui devient alors très supérieur à celui de STAT3 (Figure 7A). Nous avons confirmé cette expression par western-blot avec un anticorps dirigé contre l'étiquette V5 de la protéine (Figure 7B). L'activation constitutive de STAT4 a alors été mise en évidence par western-blot avec un anticorps anti-STAT4-P (Figure 7C). En effet, STAT4 est phosphorylé en absence d'activateur ou en réponse à une cytokine irrelevante comme le LIF, qui n'induit pas l'activation de STAT4 dans les cellules sauvages. La surexpression de STAT4 ne modifie pas l'activation de STAT3 en réponse aux cytokines et n'induit pas son activation constitutive (Figure 7C). Nous avons alors analysé l'effet de cette activation constitutive de STAT4 sur la prolifération des cellules (Figure 7D).

Les cellules transfectées avec STAT4 présentent une prolifération ralentie en comparaison des cellules sauvages avec un temps de doublement de ces cellules deux fois plus long que celui des cellules sauvages (Figure 7D). L'ajout d'OSM sur les cellules sauvages induit une inhibition de prolifération des cellules qui arrivent alors au niveau de prolifération des cellules transfectées avec ou sans ajout d'OSM. En effet, l'OSM n'a plus d'effet sur les cellules transfectées car leur prolifération est déjà inhibée en conditions contrôles. L'ensemble de ces résultats confirment donc notre hypothèse selon laquelle STAT4 serait impliqué dans l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par l'OSM et l'IL-31. Des résultats complémentaires sont en cours afin de confirmer ces observations.

Afin de comprendre les processus moléculaires mis en jeu lors de l'activation de ces cellules par l'OSM et l'IL-31, nous avons analysé, par PCR quantitative, les gènes dont l'expression est modulée par ces deux cytokines dans la lignée GO-G-UVM (Figure 8). Il est connu que l'OSM inhibe la prolifération des cellules en induisant l'expression de protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que p21. Nous avons observé cette induction de p21 en réponse à l'OSM mais également à l'IL-31. De même, l'OSM et l'IL-31 induisent l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse tels que VEGFA, PDGFA, PDGFRA, et PDGFRB. Des résultats similaires ont préalablement été observés en ce qui concerne l'OSM.

Nous confirmons ainsi cette implication de l'OSM, dans l'induction de gènes de l'angiogénèse, dans la lignée GO-G-UVM tout en mettant en évidence un effet similaire de l'IL-31. Ces deux cytokines induisent également l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement de métastases telles que l'IL-8, MMP9 et uPAR. A l'inverse, l'ensemble de ces gènes n'est pas, ou très faiblement, induit par le LIF (données non présentées). Ces résultats préliminaires suggèrent donc que l'OSM et l'IL-31 pourraient également être impliquées dans l'angiogénèse tumorale et le développement de métastases. Ces mêmes gènes ont été analysés dans la lignée GO-G-UVM surexprimant STAT4 et nous avons observé une forte expression de l'ensemble de ces gènes, en comparaison de la lignée sauvage, en absence d'activation par l'OSM ou l'IL-31. Ces résultats concordent avec l'activation constitutive de STAT4 observée dans les tests de phosphorylation (Figure 7C).

Un modèle d'induction de tumeur dans des souris Nude va être utilisé afin d'étudier l'activité de l'IL-31 et de STAT4 *in vivo* dans le développement tumoral. Ce modèle consiste à injecter des cellules tumorales, par voie sous-cutanée, afin d'induire le développement de tumeurs. Nous allons en particulier comparer la croissance des cellules tumorales GO-G-UVM sauvages avec les cellules GO-G-UVM surexprimant STAT4.

Dans cette étude nous avons mis en évidence une activité cytotatique de l'IL-31 sur des lignées tumorales, de manière similaire à l'OSM, avec une implication du facteur de transcription STAT4. Cette étude permet ainsi d'identifier de nouvelles cibles pour le développement de thérapies anti-cancéreuses et ouvre également de nouvelles perspectives concernant le rôle de STAT4 en démontrant que ce facteur de transcription n'est pas limité aux cellules hématopoïétiques.

Activation of Stat4 by OSM and IL-31: critical role in tumoral cell proliferation

Venereau E.*, Preisser L.*, Diveu C., Ravon E., Guilleux ML., Chevalier S. and Gascan H.

* the authors contributed equally to this work

INSERM U564, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France.

Introduction

Cytokines comprise a large family of secreted proteins that regulate diverse cellular programs (proliferation, survival and maturation) and are essential for the development and function of the immune, hematopoietic and nervous systems. According to their structure and their receptor, cytokines are classified in several families. Cytokines of the interleukin-6 family are multifunctional proteins involved in a variety of biological responses, including immune responses, inflammation, neural development and hematopoiesis. This family of cytokines belongs to the long-chain, four helix bundle class and includes interleukin-6 (IL-6), viral IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), interleukin-11 (IL-11), interleukin-27 (IL-27), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin like cytokine (CLC) and neuropoietin (NP). Interleukin-31 (IL-31) is a recently identified cytokine related to the cytokines of the IL-6 family according to its structure and its receptor. Indeed, IL-31 is a four-helix bundle cytokine comprising two long cross-over loops and one short loop. It signals through a heterodimeric receptor composed of gp130-like receptor (GPL)/IL-31RA and oncostatin M receptor (OSMR).

OSM shares many biological properties with the other members of this family, including growth regulation and differentiation. It was identified by its growth inhibitory activity on certain tumor cell lines. OSM transduces its signal via heterodimeric receptor complexes consisting of either gp130/LIF receptor (LIFR) or gp130/OSM receptor (OSMR). In the cytoplasm, the receptor molecules mediate the signal to the Jak (Janus kinase)-STAT (signal transducer and activator of transcription) pathway and to the MAPK (mitogen activator protein kinase) pathway. Several studies analysed these pathways in order to identify which one is required for growth inhibitory activity. Nevertheless, no result proved the involvement of one of these pathways in the cytostatic activity of OSM.

STAT proteins constitute a family of regulatory proteins involved in the control of cell growth and apoptosis. A signaling pathway through protein tyrosine kinases and STATs is used by various cytokines and growth factors to induce alterations in gene expression and cellular changes. Upon activation, STAT proteins are phosphorylated on specific tyrosines, form homo- and heterodimers, translocate to the nucleus and induce the expression of specific genes. Certain STAT family members are involved in signals that lead to apoptosis and to inhibition of proliferation. Of the seven members of this family, STAT1 has been identified most clearly with these functions. It mediates the growth-inhibitory and proapoptotic effects of IFN- γ and/or EGF. It is also required for TNF- α -induced apoptosis, though this pathway does not depend on the classical STAT1 activation mechanism. A conditional gene knockout of STAT3 in the mammary gland revealed that STAT3 is required for involution and apoptosis of this tissue after lactation. STAT5 has been implicated in IL-2-induced cell death in T cells. Genes in different classes of antiproliferative proteins such as the cdk inhibitors (p21/WAF1/CIP1), cell surface receptors (Fas and FasL) and caspases have been shown to be regulated by STAT proteins. However, genes positively acting during cell proliferation are also induced by STAT proteins. Constitutively activated STAT proteins have been found in

tumor cells, leading to the puzzle of whether STAT proteins are inducers or repressors of tumor growth. One study reports that dysfunction of STAT4 leads to accelerated incidence of chemical-induced thymic lymphomas in mice.

STAT4 was first cloned by crosshybridization with other cloned STAT proteins. It is the only STAT that was described to show tissue-restricted expression, with mRNA found mainly in lymphoid and myeloid tissues. STAT4 has been found to be mainly activated by IL-12, IL-23 and IFN- α . Initial studies of STAT4-deficient mice demonstrated that STAT4 is required for most IL-12 biological responses including IFN- γ production. It is also required for the normal differentiation of Th1 cells and expression of Th1-specific genes such as IFN- γ , lymphotoxin- α , IL-18R α or IL-12R β 2. The normal development and viability of STAT4-deficient mice has facilitated their use in a large number of models of inflammatory disease, infection and basic immune responses.

In the present study, we report that STAT4 expression is not tissue-restricted to lymphoid and myeloid tissues as described in the literature and we identified OSM and IL-31 as two new activators of this transcription factor in glioblastoma cell lines. We characterized the molecular mechanisms underlying GPL-mediated STAT-3 or STAT4-activations and we demonstrated that GPL mediates activation of these two proteins via different cytoplasmic tyrosine residues. We identified tyrosine residue 721 in the cytoplasmic region of GPL as the major STAT4-activating site. We also demonstrated that IL-31 inhibits cell proliferation of these glioblastoma cell lines, in a similar way to OSM, and importantly we show the contribution of STAT4 in the cytostatic effects of OSM and IL-31.

Material and methods

Cells and reagents

Cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Antibody raised against phospho-STAT3 was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) and anti-STAT3 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies raised against phospho-STAT4 and STAT4 were purchased from Zymed (Invitrogen). The anti-V5 antibody was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Anti-mouse and anti-rabbit peroxidase labeled immunoglobulins were from Clinisciences (Montrouge, France). Human recombinant IL-6, IL-11, OSM, CNTF, IL-12, IL-23 and IL-27 were purchased from R&D systems (Oxon, UK). Human recombinant LIF and IL-31 were produced in the laboratory as described previously. cDNA human tissues library was purchased from Clontech (Mountain View, CA).

Cloning and expression of STAT4

2 μ L of total cDNA from peripheral blood lymphocytes, activated with PMA and PHA, were amplified with the Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) using 10nM of STAT4 sense primer (CTAGCTAGCATGTCTCAGTGGAATCAAGTCCAACAG) and anti-sense primer (CCGGAATTCCATTCAGCAGAATAAGGAGACTTCATTGC). PCR product was cloned into the pcDNA4.V5-His (version B) mammalian expression vector (Invitrogen). The integrity of the construct was verified by DNA sequencing using an automatic DNA sequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). GO-G-UVM cells were transfected, using kit V reagent (Amaxa, Gaithersburg, MD), with 2.5 μ g of this plasmid. Transfected cells were treated with zeocin (100 μ g/ml) to select cells expressing the plasmid.

RT-PCR and quantitative-PCR analyses

Total RNA was extracted using RNeasy micro kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. RNA was reversed transcribed into cDNA using random hexamers primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primers were designed using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>). PCR amplifications reactions were carried out in duplicate with iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a 15µl reaction volume containing 200 nM primers and 5 ng cDNA, and using a Chromo4™ System (Bio-Rad). Thermal cycling was initiated with a 3 min incubation at 95°C followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 55 °C for 15 s and 72°C for 15s. For quantification the Δ Ct method was retained, and GAPDH gene used for normalization as described previously.

Phosphorylation and western-blotting analyses

Cells were seeded in 24-well plates and were activated for 10 min with indicated cytokines. Cells were lysed in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% bromophenol blue), sonicated and then submitted to SDS-PAGE and transferred onto Immobilon membrane. The membranes were subsequently incubated overnight with the primary antibody, before being incubated with the appropriate peroxidase-labeled secondary antibody for 60 min. The reaction was visualized by chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, Orsay, France). Membranes were stripped overnight at 4°C in glycine buffer (0.1 M/pH 2.8) before being re-blotted.

Luciferase reporter gene assay

Cells were seeded in 48-well plates and transfected, using Exgen reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France), with 0.5 µg of the SIEM-Luc or GAS-Luc reporter genes. These constructs contain three consensus binding sites located upstream of a thymidine kinase

minimal promoter (28). Twenty-four hours after transfection, cells were serum-starved for 6 h and then incubated overnight with either medium alone or with the indicated cytokines. Cells were washed with PBS, and 70 μ l of lysis buffer was added to the wells (0.1M KHPO₄, pH 7.8, 0.1% Triton X-100) before adding luciferine. The luciferase activity was measured using a Packard Topcount luminometer (Meriden, CT).

Proliferation assays

The GO-G-UVM, T98G and U87MG cell lines were seeded in 96-well plates at a concentration of $1.5 \cdot 10^3$ cells/well in RPMI 1% fetal calf serum. Serial dilutions of tested cytokines were performed in triplicate. After a 5 days incubation period, 0.5 μ Ci of ³H thymidine (Amersham, Les Ullis, France) was added to each well for the last 4 hours of the culture and the incorporated radioactivity measured by scintillation counting (Packard Top count luminometer, Meriden, CT).

1

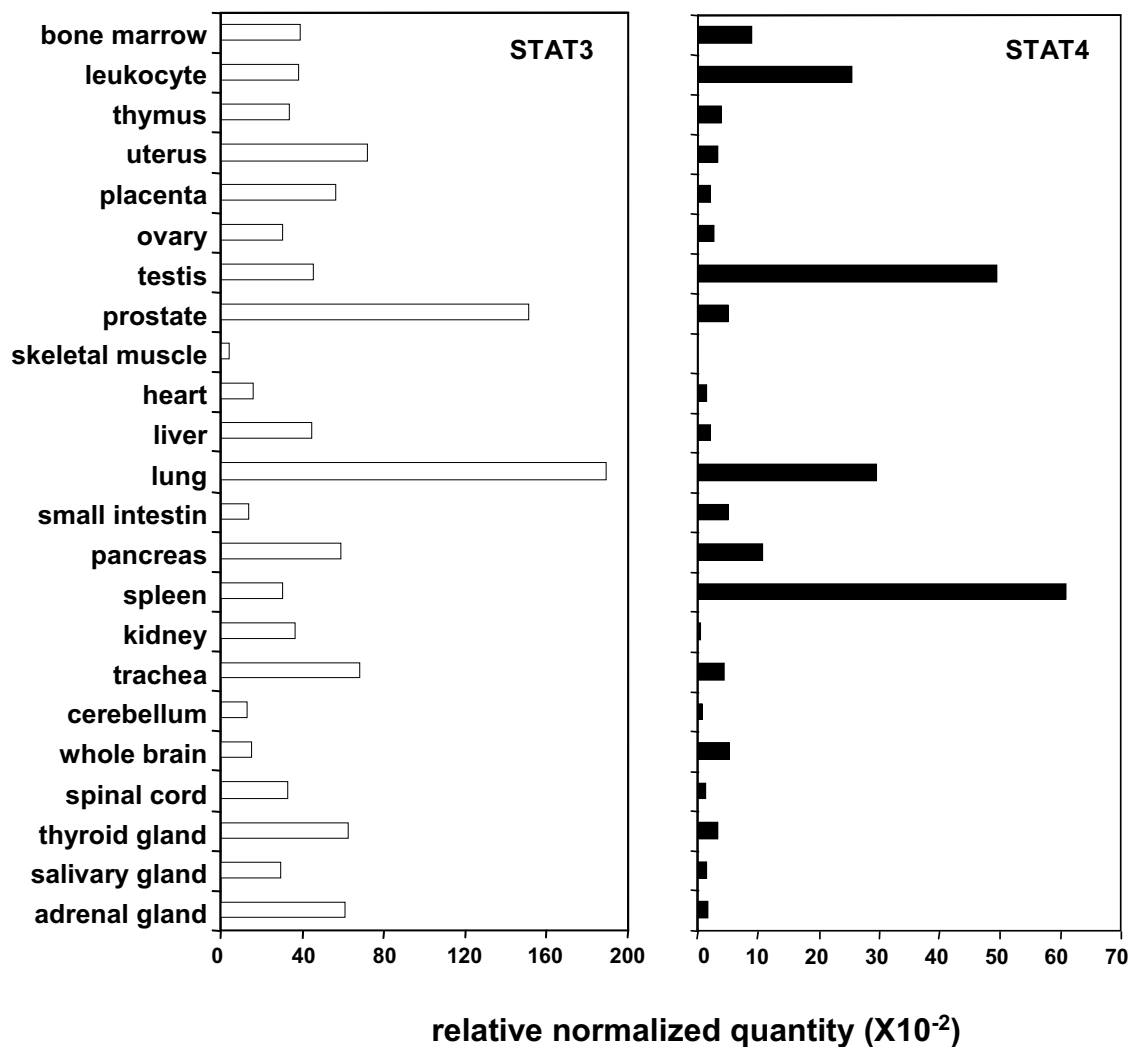
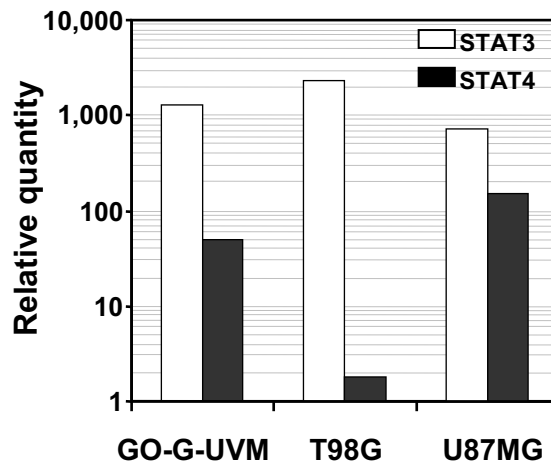


Figure 1. Analysis of STAT3 and STAT4 tissue distribution by quantitative PCR. Quantitative PCR were performed from a human tissue library using specific primers for STAT3 or STAT4.

2A



2B

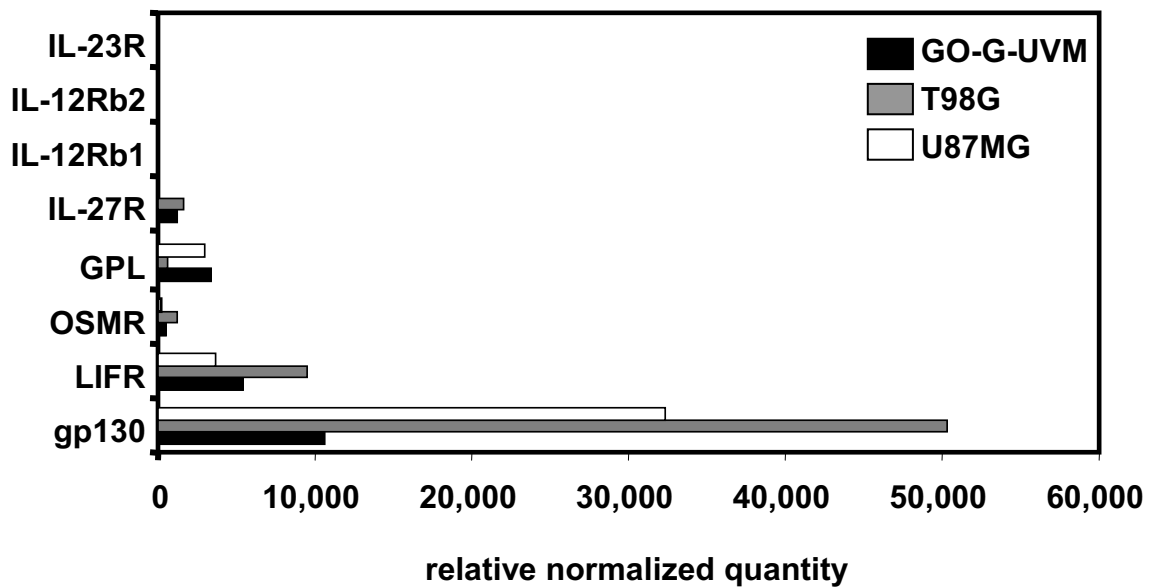


Figure 2. Analysis of STAT3, STAT4 and cytokine receptor expressions in glioblastoma cell lines. A. Quantitative PCR were performed from human glioblastoma cell lines (GO-G-UVM, T98G and U87MG) using specific primers for STAT3 or STAT4. **B.** Expression of IL-6 and IL-12 families receptors chains were analysed by quantitative PCR in GO-G-UVM, T98G and U87MG cell lines.

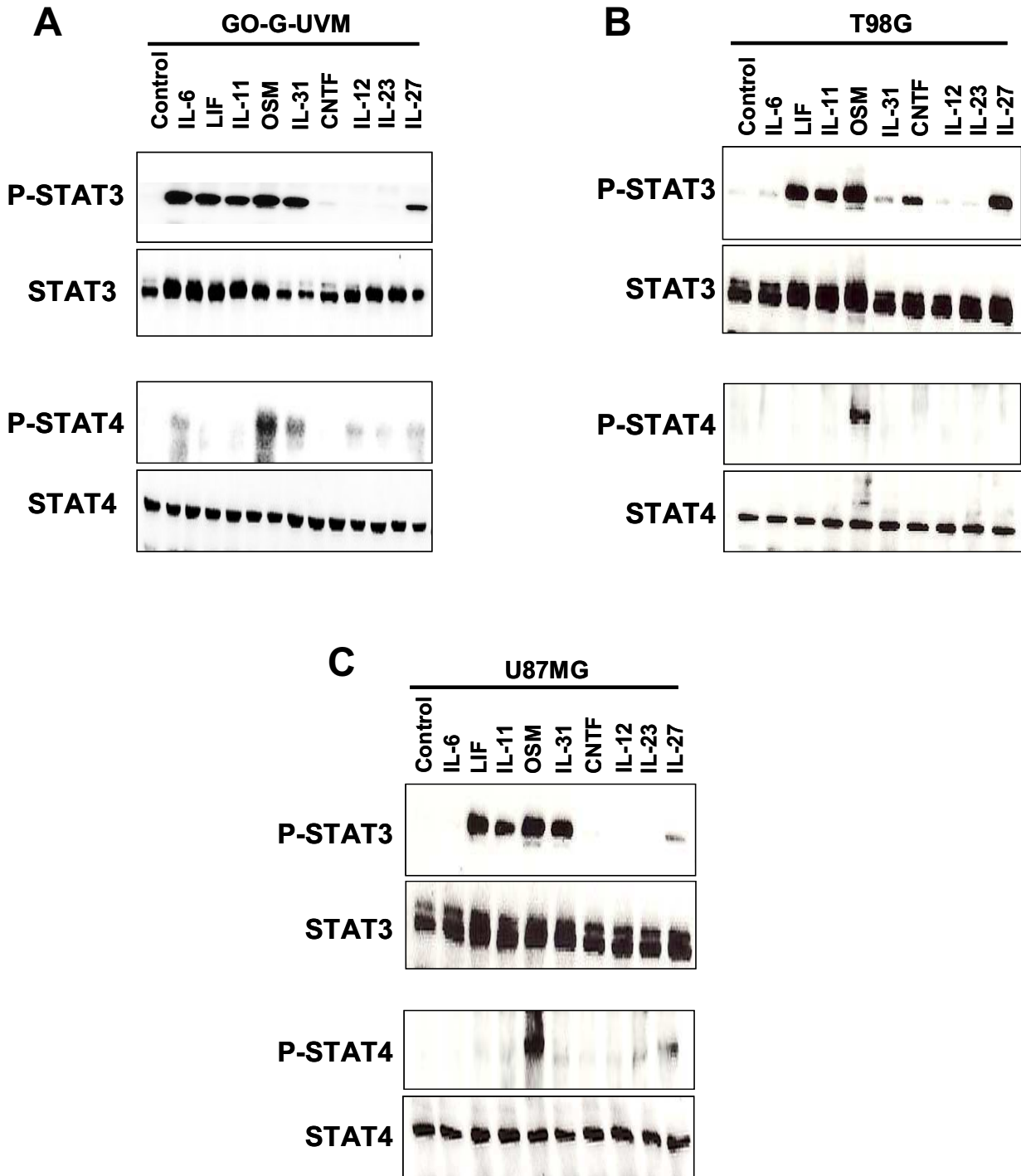


Figure 3. STAT3 and STAT4 activation in response to cytokines of IL-6 or IL-12 families. A-C. GO-G-UVM (A), T98G (B) and U87MG (C) cell lines were stimulated for 10 min at 37°C by 50 ng/ml of cytokines as indicated on the figure. STAT3 (*upper panel*) and STAT4 (*lower panel*) phosphorylation levels were determined by western-blot analyses using antibodies recognising activated protein. The blots were stripped and reprobed with an antibody recognising both activated and non-activated signaling proteins. (STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription.)

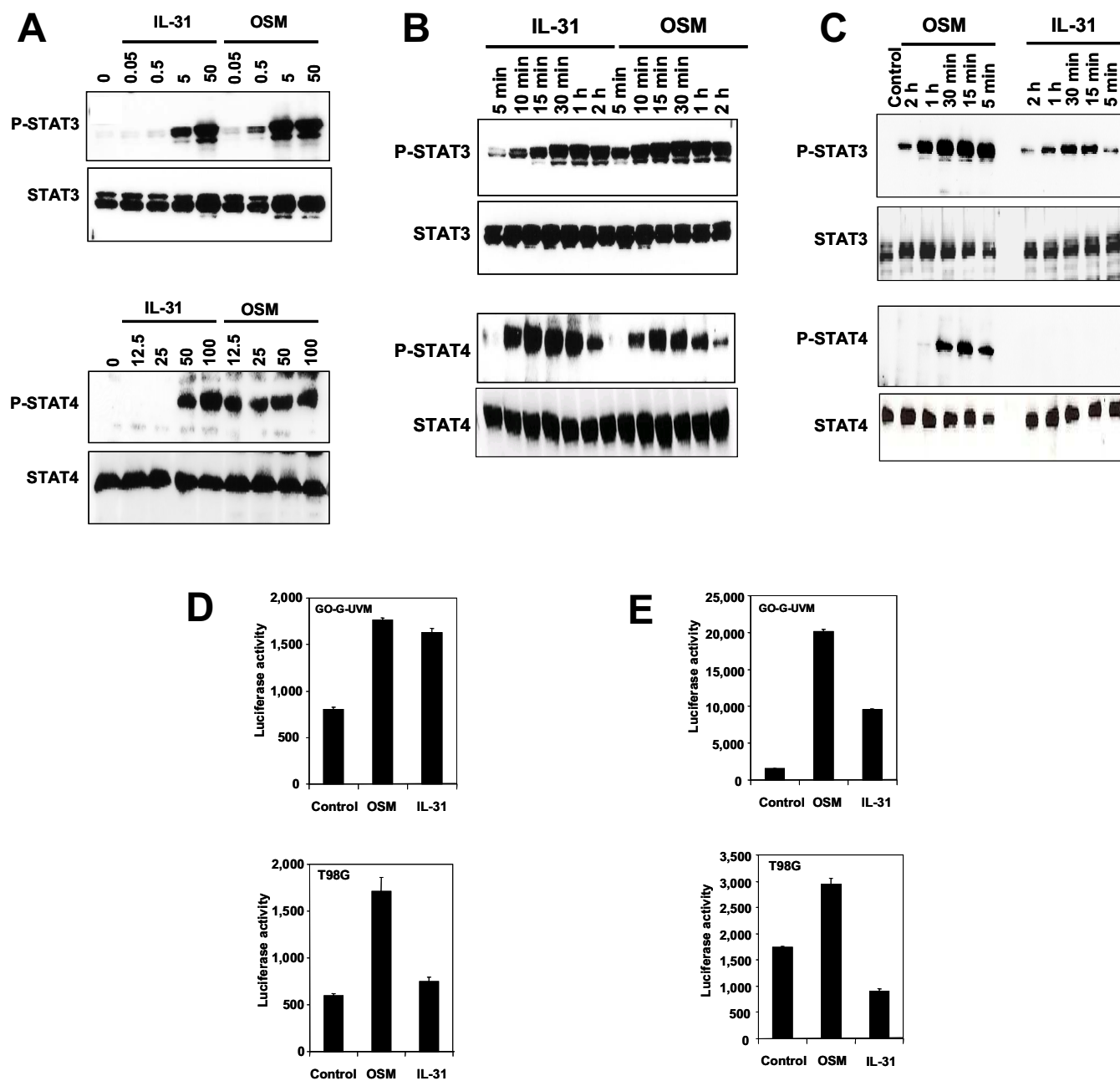
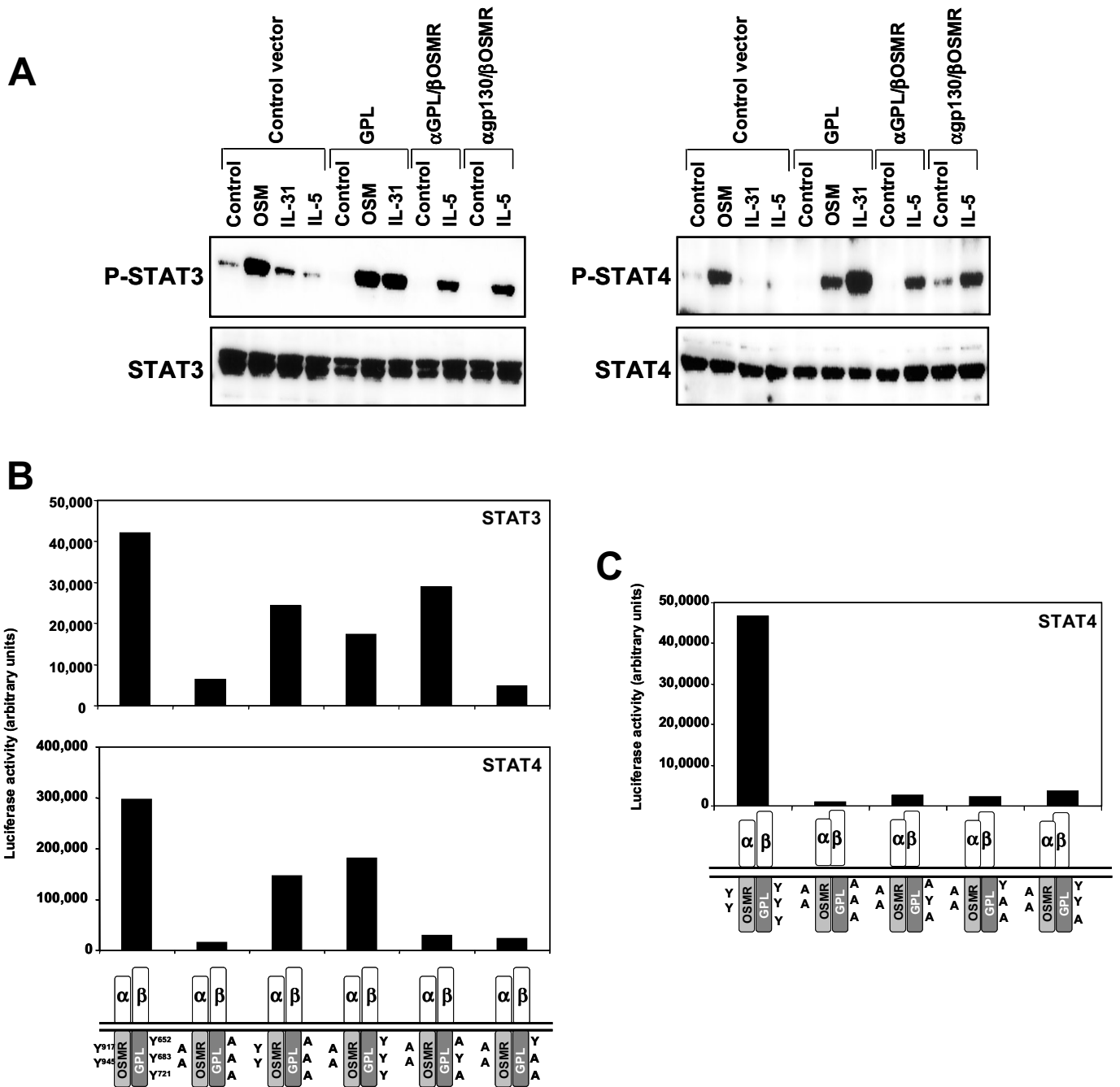


Figure 4. STAT3 and STAT4 activation in response to OSM and IL-31. **A-C.** STAT3 and STAT4 phosphorylation levels were determined by western-blot analyses using antibodies recognising activated protein. The blots were stripped and reprobed with an antibody recognising both activated and non-activated signaling proteins. (STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription.) **A.** GO-G-UVM cells were stimulated for 10 min at 37°C by several concentrations (ng/ml) of OSM or IL-31 as indicated on the figure. **B-C.** GO-G-UVM (A) and T98G (B) cells were stimulated at 37°C by 100ng/ml of OSM or IL-31 for several times as indicated on the figure. **D-E.** GO-G-UVM or T98G cells were transfected with a SIEM-Luc or GAS-Luc constructs, in order to analyze STAT3 (D) or STAT4 (E) transcriptional activity respectively, in response to 100 ng/ml of OSM or IL-31. The cytokines were added to GO-G-UVM and T98G cells for a 12 h culture period at 37°C. The STAT3 and STAT4 activation levels were measured by using a Packard Topcount luminometer (Meriden, CT).



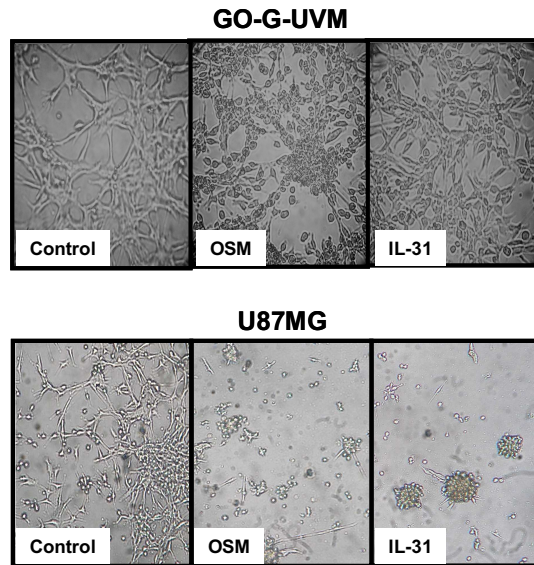
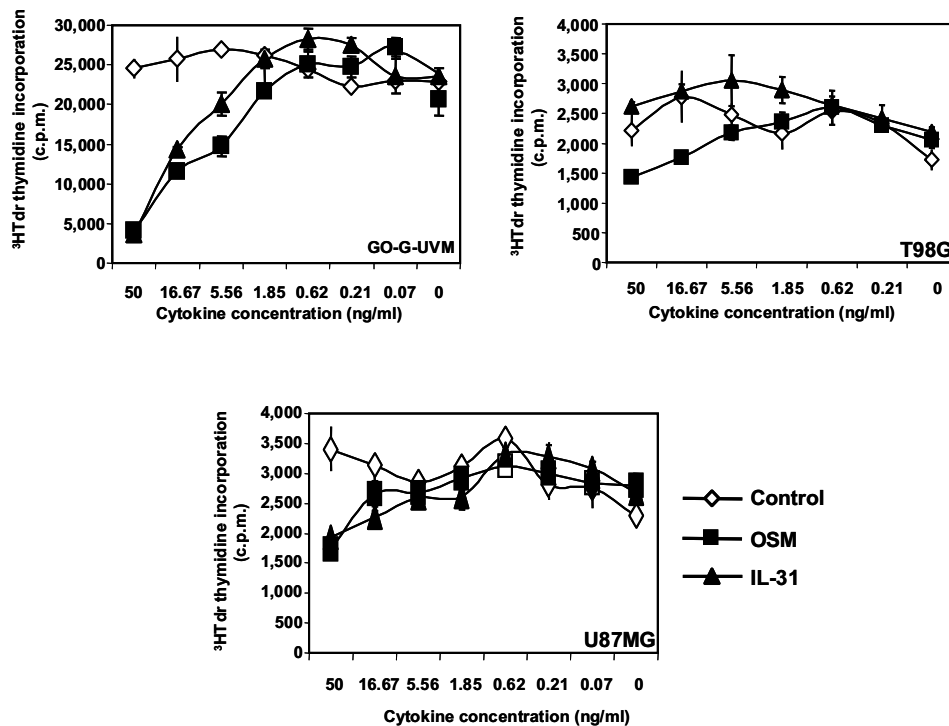
A**B**

Figure 6. OSM and IL-31 induce cytostatic effects in glioblastoma cell lines. **A.** Phase contrast micrographs of GO-G-UVM (*upper panel*) and U87MG cells (*lower panel*) after a 5-day culture period in the presence of 100 ng/ml of indicated cytokines. **B.** GO-G-UVM (*upper left panel*), T98G (*upper right panel*) and U87MG (*lower panel*) cells were cultured in triplicates with 3-fold dilutions of IL-31 or OSM. After a 5-day culture period a ³H thymidine pulse was carried out and the incorporated radioactivity determined.

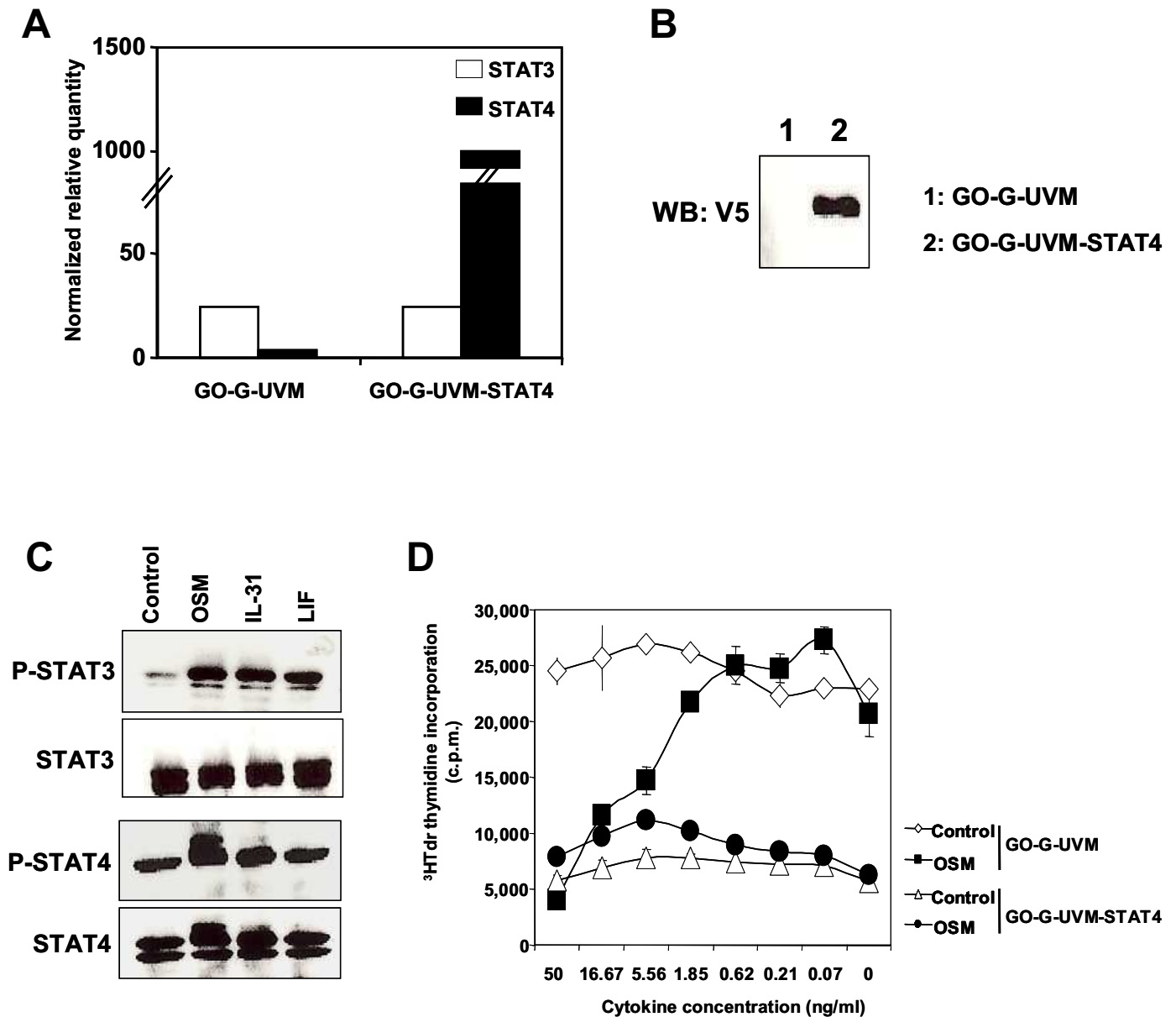


Figure 7. Constitutive activation of STAT4 in GO-G-UVM cell line induces inhibition of natural cell proliferation. **A.** Analysis of STAT3 and STAT4 expressions by quantitative PCR in GO-G-UVM cells non transfected or transfected with pcDNA4-STAT4-V5-His vector. **B.** Detection of STAT4 V5-His protein in GO-G-UVM transfected cells by western-blot analysis using an antibody directed against V5 tag. **C.** STAT3 (*upper panel*) and STAT4 (*lower panel*) phosphorylation levels were determined in GO-G-UVM-STAT4 cells by western-blot analyses using antibodies recognising activated protein. The blots were stripped and reprobed with an antibody recognising both activated and non-activated signaling proteins. **D.** GO-G-UVM and GO-G-UVM-STAT4 cells were cultured in triplicates and stimulated or not with OSM. After a 5-day culture period a ³H thymidine pulse was carried out and the incorporated radioactivity determined.

	INDUCTION FACTOR	
	OSM	IL-31
<i>IL-6</i>	50.2	41.9
<i>IL-6R</i>	6.3	4.6
<i>p21</i>	3.4	3.1
<i>VEGFA</i>	9.1	10.3
<i>PDGFA</i>	8.3	8.9
<i>PDGFRA</i>	5.0	3.8
<i>PDGFRB</i>	4.4	3.9
<i>IL-8</i>	17.1	9.8
<i>MMP9</i>	4.1	7.8
<i>uPar</i>	7.1	6.4

Figure 8. Expression profile of genes induced by OSM or IL-31 in GO-G-UVM cell line. GO-G-UVM cells were stimulated by 50 ng/ml of OSM or IL-31 for 6 h and screening of genes expression induced by the cytokines was performed by quantitative PCR.

DISCUSSION

La réponse immunitaire est organisée autour des interactions entre les cellules du système immunitaire. La communication entre ces cellules est assurée par des contacts cellulaires mais également par des facteurs solubles tels que les cytokines. Depuis leur découverte, ces dernières constituent un domaine d'investigation essentiel en immunologie. En effet, elles représentent un langage universel pour l'ensemble des cellules de l'organisme. Contrairement à d'autres médiateurs solubles, tels que les hormones, les cytokines sont caractérisées par leurs activités pléiotropes et redondantes, ainsi que leurs actions qui peuvent être autocrines, paracrines, juxtacrines voir même endocrines. La redondance de leurs activités biologiques peut s'expliquer en grande partie par leurs récepteurs membranaires, qui sont souvent partagés par plusieurs cytokines. Quant à leur pléiotropie, elle s'explique par la distribution, souvent étendue, de leurs récepteurs d'où un grand nombre de cellules cibles différentes. Au fur et à mesure des connaissances, les cytokines ont été classées en différentes familles dont la famille de l'IL-6, à laquelle nous nous intéressons plus particulièrement.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont aujourd'hui au nombre de onze. Elles exercent des activités redondantes qui permettent de les classer en différents sous-groupes. Certaines agissent plus particulièrement au niveau du système nerveux : il s'agit de la NP, de CLC et du CNTF. En ce qui concerne le LIF et la CT-1, ces deux cytokines sont essentielles au développement. Les autres membres de la famille agissent essentiellement au niveau de l'hématopoïèse, des réponses immunitaires et de l'inflammation. Il s'agit de l'IL-6, de l'IL-11, de l'IL-27, de l'OSM et de la dernière cytokine apparentée à cette famille : l'IL-31. Les axes de recherche de ma thèse ont été orientés autour de l'étude de ces deux dernières cytokines.

1. OSM et IL-31 : deux cytokines à tropisme cutané ?

L'Oncostatine M, comme son nom l'indique, a d'abord été identifiée pour ses propriétés cytostatiques. En plus de ses activités spécifiques, l'OSM agit également sur des systèmes biologiques communs aux autres cytokines de la famille tels que l'activation hépatocytaire inflammatoire, le maintien des cellules souches embryonnaires dans un état indifférencié, le développement nerveux ou le remodelage osseux. Ce qui ressort surtout de la littérature, ce sont les résultats contradictoires concernant l'implication de cette cytokine dans les réponses inflammatoires. En effet, l'OSM exercerait des activités proinflammatoires ou à l'inverse anti-inflammatoires selon les études. Wallace et ses collaborateurs démontrent ainsi

que l'OSM régulerait les réponses inflammatoires au niveau des fibroblastes pulmonaires ou synoviaux en inhibant l'expression de l'IL-8 et de GM-CSF et en induisant la sécrétion de protéines de la phase aiguë et d'inhibiteurs de protéases, protéines impliquées dans la régulation de l'inflammation (352). L'effet bénéfique de l'OSM a également été mis en évidence dans différents modèles de pathologies inflammatoires chez la souris telles que l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaque. Cependant, de nombreuses études démontrent un effet inverse de l'OSM ainsi que son implication dans différentes pathologies telles que l'asthme ou l'arthrite (264). Les résultats contradictoires de ces études peuvent s'expliquer par la spécificité d'espèce de l'OSM. En effet, certaines de ces études concernent l'effet de l'OSM humaine chez la souris. Or l'OSM murine n'interagit qu'avec le récepteur de type II (OSMR/gp130) chez la souris. A l'inverse, la cytokine humaine interagit uniquement avec le récepteur de type I (LIFR/gp130) chez la souris : elle mime ainsi les effets du LIF. En tenant compte de cette observation, il est évident que l'OSM est un médiateur proinflammatoire.

L'implication de l'OSM au niveau de pathologies pulmonaires est un exemple de résultats controversés. En effet, une revue sur le rôle de l'OSM dans l'asthme décrit une activité anti-inflammatoire au niveau pulmonaire (353). Elle exercerait une activité profibrotique mais également anti-protéolytique au niveau des poumons. Ainsi, elle serait impliquée dans la réparation des tissus pulmonaires. Cependant, sa surexpression chez la souris au niveau pulmonaire induit une réponse inflammatoire démontrant ainsi l'implication de l'OSM dans l'inflammation pulmonaire. Selon le modèle, l'OSM induit également l'expression, par les cellules musculaires lisses des voies respiratoires, de l'éotaxine-1, protéine impliquée dans l'éosinophilie asthmatique (354). De plus, l'OSM est produite par les cellules infiltrant les tissus chez des patients atteints d'asthme et l'OSMR est exprimé en abondance par les cellules musculaires lisses des voies respiratoires de patients asthmatiques. Quant à gp130, son gène est situé sur la région 5q où sont localisés des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'asthme. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer le rôle exact de l'OSM dans l'asthme ainsi que dans d'autres pathologies pulmonaires. En effet, une étude récente suggère une implication de l'OSM dans la tuberculose (355).

De manière similaire, les activités de l'OSM sur la formation ou la résorption osseuse semblent complexes mais certaines études ont été réalisées avec la cytokine humaine chez la souris. Si on considère uniquement les études concernant l'effet de la cytokine murine chez la souris, un effet proinflammatoire de l'OSM est mis en évidence de manière irréfutable. Ces études ont été réalisées en induisant une surexpression d'OSM à l'aide d'adénovirus (356,

357). Cette surexpression induit une inflammation avec le recrutement de cellules inflammatoires, une dégradation du cartilage et une hyperplasie synoviale, symptômes similaires à l'arthrite rhumatoïde (AR). Ces effets de l'OSM impliquent la balance MMPs/TIMPs, la balance RANK/RANKL ainsi que la sécrétion de chimiokines. L'OSM agit en synergie avec le TNF- α et l'IL-1, cytokines proinflammatoires impliquées dans l'AR (358, 359). Ces résultats sont renforcés par une étude dans laquelle un traitement, avec un anticorps neutralisant l'OSM, est efficace dans deux modèles d'arthrite chez la souris (360). Concernant les études chez l'homme, une surexpression d'OSM est observée dans les liquides synoviaux de patients atteints d'AR mais pas dans le sérum, suggérant une activité locale, et non systémique, de cette cytokine. De plus, la concentration d'OSM est corrélée avec la présence de marqueurs de dégradation du cartilage dans les liquides synoviaux de ces patients. L'ensemble de ces données démontre donc l'implication de l'OSM dans le réseau cytokinique à l'origine de cette pathologie. Des études complémentaires permettront de confirmer si cette cytokine représente une cible à considérer dans le développement de thérapies visant à traiter cette pathologie.

Récemment en collaboration avec l'équipe du Dr. Jean-Claude Lecron, nous avons mis en évidence l'implication de l'OSM dans l'inflammation cutanée et plus particulièrement dans une pathologie inflammatoire cutanée : le psoriasis (263). D'autres études confirment ces résultats et démontrent la présence d'OSM dans différentes conditions pathologiques au niveau de la peau telles que des lésions psoriasiques, des kératoacanthomes ou des carcinomes spinocellulaires (258-260). Ainsi, cette cytokine posséderait également un tropisme cutané, de manière similaire à une cytokine récemment identifiée: l'interleukine-31.

L'interleukine-31 est apparentée aux cytokines de la famille de l'IL-6 de par sa structure et son récepteur. En effet, il s'agit d'une cytokine en quatre hélices α , structure caractéristique des cytokines de cette famille. De plus, son récepteur hétérodimérique est constitué d'une part d'OSMR, chaîne partagée avec l'OSM, et d'autre part de GPL, identifié à partir d'homologies avec gp130. Cependant, ce qui définit les cytokines de la famille de l'IL-6 est leur interaction avec la chaîne réceptrice commune appelé gp130. Ainsi, l'IL-31 est apparentée aux cytokines de cette famille sans réellement pouvoir y être classée. Cette cytokine a récemment été identifiée et par conséquent, elle est encore mal connue et peu de ses activités ont été décrites. Cependant, l'élément principal qui ressort de la littérature est son tropisme cutané. En effet, le groupe de Zymogenetics, qui a identifié cette cytokine, a mis en évidence son implication dans une pathologie cutanée : la dermatite atopique. Sa

surexpression, de manière transgénique ou par des injections, induisent chez la souris une alopecie, une hyperkératinose, un prurit ainsi que des lésions cutanées caractérisées par une infiltration de cellules inflammatoires. Ces symptômes sont similaires à ceux observés chez des patients atteints de dermatite atopique. Cependant, l'IL-31 serait associée à la forme intrinsèque de la maladie car les souris transgéniques IL-31 ne présentent pas de taux sériques d'IgE élevés contrairement à d'autres modèles de dermatite atopique comme les souris transgéniques IL-4 ou IL-8, et les souris NC/Nga.

Les kératinocytes humains expriment les deux chaînes réceptrices de l'IL-31 et par conséquent, cette dernière peut les activer. Elle stimule ainsi la sécrétion de chimiokines telles que CCL17 (TARC) et CCL22 (MDC) (175). Or, ces deux chimiokines se lient à CCR4, un récepteur préférentiellement exprimé par les lymphocytes Th2 CLA+. Comme nous l'avons préalablement vu dans l'introduction, ces cellules produisent de l'IL-31 et sont impliquées dans la pathogénèse de la dermatite atopique (269). Ainsi, l'IL-31 serait impliquée dans l'amplification de la maladie en recrutant ces cellules par l'intermédiaire de chimiokines. Cependant, il faut noter que ces résultats concernent l'activation transcriptionnelle et il serait donc nécessaire de les confirmer en dosant les protéines. En effet, des expériences similaires de PCR quantitative réalisées au laboratoire n'ont pas permis de confirmer ces résultats.

La dermatite atopique aiguë est principalement de type Th2 alors que la forme chronique est caractérisée par des cytokines de type Th1. Un traumatisme cutané mécanique peut être à l'origine de la transition de la forme aiguë vers la forme chronique de la maladie, caractérisée par une sécrétion de cytokines proinflammatoires par les kératinocytes. Cette transition est observée après l'apparition de démangeaisons. L'IL-31 est préférentiellement produite par les lymphocytes Th2 mais elle est également sécrétée par les lymphocytes Th1. Par conséquent, elle pourrait être impliquée dans les phases aiguë et chronique ainsi que dans le processus de transition entre ces deux phases. Des études sur l'IL-31 dans des souris déficientes en mastocytes ou en lymphocytes ont montré une implication des lymphocytes dans l'alopecie induite par l'IL-31 mais aucune implication des mastocytes dans les effets de l'IL-31 (175).

Au début de ma thèse, l'IL-31 avait été clonée uniquement chez l'homme et chez la souris. Afin d'envisager des études de l'IL-31 *in vivo* chez le rat, nous avons identifié et cloné l'IL-31 de rat. Nous avons réalisé des études bioinformatiques par alignement de séquences orthologues afin d'identifier la séquence de l'IL-31 de rat. Une étude par PCR quantitative sur une banque de tissus nous a permis d'identifier les tissus présentant des taux élevés d'IL-31 chez le rat tels que la vessie ou le thymus. Ainsi, nous avons cloné la cytokine à partir du tissu

exprimant le taux d'IL-31 le plus élevé : les testicules. Nous avons produit la protéine ainsi clonée en système eucaryote et nous l'avons purifiée par affinité. La suite de l'étude consistait évidemment à vérifier la fonctionnalité de la protéine purifiée. Nous avons donc recherché des cellules-cibles, c'est-à-dire des cellules exprimant GPL et OSMR, les chaînes réceptrices de l'IL-31. Nous avons analysé leur expression respective par PCR quantitative dans les tissus de rat. L'expression de l'OSMR est ubiquitaire tandis que celle de GPL est beaucoup plus restreinte et surtout moins élevée. De manière très intéressante, la peau présente une expression élevée de GPL suggérant ainsi que l'IL-31 aurait également un tropisme cutané chez le rat. Nous avons ensuite identifié deux lignées cellulaires exprimant GPL et OSMR : les lignées Mat Ly Lu et Walker, dérivées de carcinomes. Dans ces deux lignées, l'IL-31 de rat induit l'activation de différentes voies de signalisation telles que STAT3 ou les MAPKs.

Il est intéressant de noter que l'IL-31 semble être une cytokine avec une très grande spécificité d'espèce. En effet, nous avons préalablement observé que l'IL-31 humaine n'agit pas sur les cellules murines et à l'inverse la cytokine murine n'a aucun effet sur les cellules humaines. De même, dans cette étude nous avons mis en évidence que l'IL-31 murine n'active pas les cellules de rat. Cette observation la différencie de l'OSM puisque cette dernière est capable d'agir sur plusieurs espèces. En effet, il est connu que l'OSM humaine agit également sur la souris et dans cette étude nous avons également observé que l'OSM murine active également les cellules de rat. Cette grande spécificité d'espèce de l'IL-31 facilite la génération d'anticorps spécifiques de l'IL-31 murine chez le rat. Un anticorps commercial, dirigé contre l'IL-31 murine, a ainsi été généré chez le rat. De plus, il serait intéressant d'induire une surexpression d'IL-31 chez des rats afin d'étudier leur phénotype et de le comparer à celui des souris. D'après nos résultats préliminaires, l'IL-31 semble avoir un tropisme cutané également chez le rat et on peut donc supposer que sa surexpression induirait un phénotype particulier au niveau de la peau. Nous disposons ainsi d'un nouveau modèle afin d'étudier les effets de l'IL-31 *in vivo*.

A l'heure actuelle, les études réalisées chez la souris et chez l'homme mettent en évidence une corrélation entre l'expression de l'IL-31 et le prurit, symptôme qui recouvre une sensation de démangeaison fréquemment observée dans des pathologies cutanées. En effet, une expression élevée d'IL-31 est montrée chez des patients atteints de pathologies prurigineuses telles que la dermatite atopique, la dermatite allergique de contact ou le prurigo nodularis (273, 274). De plus, son expression est corrélée avec l'intensité des démangeaisons. En effet, le prurigo nodularis représente une des pathologies cutanées inflammatoires les plus prurigineuses et les patients atteints de cette pathologie présentent les taux d'IL-31 les plus

élevés. Une étude décrit même l'IL-31 comme un nouveau lien entre les cellules T et le prurit (273). Dans un premier temps, ce symptôme a été attribué à l'histamine. Or, des antagonistes du récepteur de l'histamine n'ont pas ou peu d'effets sur les démangeaisons. Par conséquent, l'histamine ne serait pas le facteur principal inducteur de prurit et l'IL-31 représente donc un facteur à considérer (361, 362). A l'inverse, l'IL-31 ne semble pas être surexprimée chez des patients atteints de psoriasis, pathologie non prurigineuse. Cependant, nous avons réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Jean-Claude Lecron, une étude portant sur les effets de l'IL-31 sur la peau et plus particulièrement dans le psoriasis. D'après les résultats de cette étude, les effets de l'IL-31 semblent beaucoup plus modérés que ceux de l'OSM mais ne permettent pas d'exclure son implication dans le psoriasis.

Ces observations ont été confirmées chez la souris, dans un modèle de dermatite atopique : les souris NC/Nga. Ces dernières développent spontanément un phénotype ressemblant à la dermatite atopique, lorsqu'elles sont élevées dans un environnement non exempt de tout pathogène. Dans cette étude, une très forte corrélation a été observée entre l'expression de l'IL-31 et l'apparition des démangeaisons chez les souris. En effet, une surexpression d'IL-31 est retrouvée au niveau cutané lors de l'apparition des démangeaisons chez les souris, développant spontanément des lésions cutanées. A l'inverse, dans un modèle d'induction de lésions cutanées par haptènes, les souris n'ont pas de démangeaisons et aucune surexpression d'IL-31 n'est observée. L'ensemble de ces données démontre donc l'implication de l'IL-31 dans le prurit. Cependant, le mécanisme par lequel cette cytokine est impliquée dans l'apparition des démangeaisons n'est pas encore élucidé. Une étude, démontrant l'expression de GPL et de l'OSMR par des neurones de ganglions rachidiens, pourrait ainsi apporter une explication (363). En effet, la sensation de démangeaison est transmise par ces neurones sensoriels, dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions rachidiens et dont les projections arrivent au niveau de la peau. Ainsi, l'IL-31 pourrait induire les démangeaisons en modulant directement l'activité des neurones sensoriels. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer le rôle exact de l'IL-31, mais également de l'OSM, sur ces neurones sensoriels ainsi que leur implication dans le prurit.

La surexpression d'IL-31 observée dans la dermatite atopique semble être partiellement induite par des allergènes (273). Or, ces derniers sont impliqués dans l'inflammation cutanée de type atopique car leur application locale, au niveau de la peau non lésée de patients atteints de dermatite atopique, induit des lésions cutanées caractéristiques de cette pathologie. D'autre part, plus de 90% des lésions cutanées sont colonisées par des bactéries *Staphylococcus aureus* et des superantigènes issus de cette souche bactérienne

induisent l'expression d'IL-31 par les leukocytes du sang périphérique. Ces superantigènes induisent également l'expression de chimiokines impliquées dans le recrutement de cellules T et de cellules dendritiques au niveau des lésions. Par conséquent, le recrutement de ces leukocytes et la production d'IL-31 par les lymphocytes T pourraient contribuer au maintien et à l'exacerbation de l'inflammation et du prurit au niveau des lésions cutanées atopiques colonisées par des bactéries *Staphylococcus aureus*.

Enfin, une étude a démontré une corrélation entre une mutation de l'OSMR et une autre pathologie cutanée : le lichen amyloïde (267). Ainsi, tout comme l'OSM, l'IL-31 pourrait également être impliquée dans cette pathologie. Cette étude confirme parfaitement le tropisme cutané de ces deux cytokines. En effet, une mutation de l'OSMR semble être associée à une pathologie cutanée. Dans ce cas particulier, ce tropisme cutané peut s'expliquer en partie par l'expression des récepteurs de ces cytokines au niveau de la peau. En effet, l'OSM peut se fixer à deux types de récepteur mais les kératinocytes n'expriment que le récepteur de type II. Par conséquent, le LIF ne peut pas remplacer les activités de l'OSM, *via* le récepteur de type I, au niveau de la peau dans le cas de cette mutation sur l'OSMR. Ainsi, cette mutation empêche l'activité de l'OSM mais également celle de l'IL-31. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer le rôle respectif de ces deux cytokines dans ces maladies et d'étendre l'étude à d'autres pathologies cutanées.

L'ensemble des données confirme l'implication de ces deux cytokines dans l'inflammation cutanée. Par conséquent, des antagonistes de ces cytokines pourraient permettre de mieux définir le rôle de chaque cytokine tout en représentant un intérêt thérapeutique dans le traitement de pathologies qui leur sont associées. C'est dans cette optique que nous avons entrepris au laboratoire la génération d'antagonistes spécifiques de chacune de ses cytokines.

2. Génération et analyse fonctionnelle des antagonistes de l'OSM et de l'IL-31

Comme nous l'avons précédemment vu dans l'introduction, il existe différentes stratégies permettant d'inhiber une cytokine. Les critères essentiels pour qu'un antagoniste soit efficace sont : son affinité, sa spécificité et sa nature protéique. Ainsi, la stratégie la plus fréquemment employée est l'utilisation d'anticorps car elle présente de nombreux avantages. En effet, l'affinité des anticorps est en général très élevée (de l'ordre de 100 à 2000 pM) et elle est souvent meilleure que celle des récepteurs membranaires. Concernant la spécificité

vis-à-vis de la protéine cible, elle est également très bonne même si certains anticorps ne sont pas spécifiques d'espèce. Seul le troisième critère pose problème puisque la majorité des anticorps sont générés chez la souris et peuvent par conséquent, être reconnus par le système immunitaire en tant que protéines étrangères chez l'homme. Ainsi, ils induisent une immunisation à l'origine d'une perte d'efficacité *in vivo*. Afin de contourner cet effet délétère, une humanisation des anticorps peut être réalisée mais les résultats restent partiels.

Il existe des antagonistes naturels de cytokines : il s'agit de formes solubles des récepteurs de cytokines. La mise en évidence de ces récepteurs solubles naturels a permis l'émergence d'une nouvelle génération d'antagonistes. Les récepteurs de cytokines étant homo- ou hétérodimériques, les premiers antagonistes élaborés étaient constitués des domaines extracellulaires des chaînes réceptrices, domaines de fixation du ligand, fusionnés avec un fragment constant (Fc) d'immunoglobuline. Ce fragment Fc permet une dimérisation augmentant ainsi l'efficacité et la durée de vie de ces molécules chimériques. Ainsi, ces protéines sont des récepteurs solubles, similaires à leurs équivalents membranaires, destinés à piéger les cytokines. Ces antagonistes appelés « cytokine-traps » ont d'abord été générés pour l'IL-1, l'IL-4 et l'IL-6 (347, 364, 365). Des constructions similaires avaient déjà été réalisées pour le VEGF et le TNF- α (364, 365). Certains de ces antagonistes ont été testés *in vivo* en phase clinique II. C'est le cas pour l'IL-1-trap dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et l'IL-4-trap dans le traitement de l'asthme. Quant à l'antagoniste du TNF- α , appelé Etanercept, il est utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde mais également du psoriasis. En effet, ces protéines chimériques répondent à tous les critères définissant l'efficacité d'un antagoniste. Leur affinité est excellente (de l'ordre de 1 pM), supérieure à celle des récepteurs membranaires et même à celle des anticorps. Ils sont très spécifiques et étant entièrement constitués de fragments protéiques humains, ils n'entraînent donc pas de réponse immunitaire.

Des études de mutagenèse et de modélisation moléculaire ont permis de définir plus précisément les domaines d'interaction des cytokines avec leurs récepteurs. Ainsi, certains antagonistes générés sont des mutants de cytokines tels que l'antagoniste de l'IL-15 ou plus récemment un antagoniste du LIF (366, 367). Ces derniers interagissent avec les récepteurs membranaires sans induire de signalisation intracellulaire : il s'agit d'antagonistes par compétition. Certaines mutations permettent également d'augmenter l'affinité de ces mutants pour les récepteurs favorisant ainsi leur interaction par rapport aux cytokines naturelles. De même que pour les « cytokine-traps », ces mutants sont fusionnés avec le fragment Fc des immunoglobulines. En effet, les cytokines sont de petite taille et par conséquent, leur demie-

vie *in vivo* est très courte (demie-vie de 5 à 50 minutes dans le sérum). Cette donnée n'est pas compatible avec une application clinique car cela nécessite des administrations fréquentes par injection, la voie orale étant exclue dans ce cas. Ainsi, une des priorités dans l'utilisation d'agents anti-cytokines, ou de cytokines elles-mêmes, était d'augmenter leur demie-vie. C'est pour cette raison que l'utilisation du fragment Fc a émergé. En effet, ce dernier augmente la taille des molécules chimériques, leur stabilité et par conséquent leur demie-vie *in vivo*.

L'équipe de Peter Heinrich a généré des antagonistes de l'IL-6 et du LIF sur un principe similaire aux « cytokine-traps » sans utiliser le fragment Fc (349, 350). En effet, leur modèle est basé sur les données structurales des cytokines et de leurs récepteurs. Ainsi, ils ont conçu des peptides de liaison afin de lier les domaines d'interaction avec la cytokine des différentes chaînes réceptrices. Certains peptides de liaison ont été synthétisés *in vitro*. Ils ont été choisis selon une étude de modélisation moléculaire qui a permis d'évaluer la distance, entre les deux chaînes réceptrices, nécessaire pour obtenir une flexibilité suffisante. Cette propriété est importante car elle détermine la conformation de la protéine chimérique qui doit être optimale afin de fixer la cytokine. Ces peptides sont donc constitués d'environ 40 acides aminés de petite taille. Ils ont également utilisé un peptide répondant à ces critères et correspondant à la courte partie extracellulaire proximale à la région transmembranaire de l'IL-6R α . Ce peptide présente un avantage supplémentaire : il n'est pas immunogène car il est dérivé de l'IL-6R α endogène. L'ensemble de ces peptides a été testé afin de générer des antagonistes de l'IL-6 et toutes ces constructions se sont révélées efficaces.

Contrairement aux « cytokine-traps », ces antagonistes ne sont constitués que des domaines essentiels à la fixation de la cytokine. Dans le cas de l'antagoniste de l'IL-6, il s'agit des domaines CBD et « Ig-like » de gp130 et du domaine CBD de l'IL-6R α . En effet, les données concernant les sites d'interaction entre la cytokine et son récepteur sont suffisantes pour déterminer les régions minimales requises à la fixation de la cytokine. Il est maintenant reconnu que les domaines extracellulaires impliqués dans la fixation de la cytokine sont les domaines CBD et « Ig-like ». Les domaines FnIII sont quant à eux impliqués dans la dimérisation des chaînes réceptrices. Ces derniers ne sont pas nécessaires dans ce type de construction car le peptide de liaison joue ce rôle. L'étude récente sur la génération d'antagonistes du LIF confirme ces observations. En effet, dans cette étude, ils ont généré plusieurs antagonistes constitués de différentes combinaisons de domaines du LIFR associés aux domaines D2 et D3 de gp130 (domaine CBD). Ils ont par exemple construit des antagonistes constitués des domaines D1 à D3 ou des domaines D2 à D5 du LIFR. Les

combinaisons possibles testées montrent que les domaines D1 à D5 du LIFR (domaines CBD et « Ig-like ») sont nécessaires pour une inhibition maximale de l'activité du LIF.

Une comparaison du modèle des « cytokine-traps » avec le modèle de l'antagoniste de l'IL-6 généré par l'équipe de Peter Heinrich met en évidence que ce dernier semble être le plus performant. En effet, ils suggèrent que leur antagoniste exerce une activité neutralisante dix fois supérieure à celle de l'hétérodimère gp130s-Fc/IL-6R α s-Fc. Cependant, cette observation n'est fondée que sur des calculs de ratios cytokine/antagoniste à partir d'expériences réalisées indépendamment. Des expériences supplémentaires, en testant simultanément les deux antagonistes, seraient nécessaires afin de confirmer cette observation. Un autre avantage de ce modèle qui a attiré notre attention est la purification. En effet, la présence du fragment Fc induit des dimérisations souhaitées mais également non souhaitées. Ainsi, concernant l'antagoniste de l'IL-6, il est nécessaire de séparer l'hétérodimère gp130s-Fc/IL-6R α s-Fc des homodimères gp130s-Fc ou IL-6R α s-Fc. Il existe également une construction similaire où les formes solubles de gp130 et de l'IL-6R α sont disposées de manière linéaire permettant ainsi d'obtenir un homodimère gp130s-IL-6R α s-Fc. Cependant, des questions se posent quant à l'encombrement stérique et à la flexibilité de cette molécule chimérique. En effet, cette protéine est constituée de l'intégralité des régions extracellulaires de chaque chaîne réceptrice multipliée par deux du fait de la dimérisation. L'ensemble de ces observations nous a amenés à choisir le modèle mis au point par l'équipe de Peter Heinrich, afin de générer des antagonistes de l'IL-31 et de l'OSM.

Nous avons démontré l'existence d'une forme soluble de l'OSMR qui exerce, en combinaison avec la forme soluble de gp130, des activités antagonistes vis-à-vis de l'OSM (368). Afin de potentialiser cette capacité d'inhibition, nous avons généré une protéine de fusion, appelée OSMR-L-GPL, constituée d'une part des domaines CBD et « Ig-like » de l'OSMR et d'autre part des domaines CBD et « Ig-like » de gp130. Nous avons utilisé le peptide de liaison correspondant à la partie extracellulaire proximale à la région transmembranaire de l'IL-6R α . Dans un premier temps, nous avons vérifié l'interaction spécifique de cet antagoniste avec l'OSM. OSMR-L-GPL se fixe à l'OSM mais pas à l'IL-31, cytokine qui interagit également avec l'OSMR. Nous avons également démontré par cytométrie de flux que l'antagoniste inhibe la fixation de l'OSM sur les cellules. De plus, nous avons mis en évidence l'activité antagoniste de la protéine de fusion dans des expériences de signalisation cellulaire tout en confirmant sa spécificité. En effet, l'antagoniste inhibe l'activation induite par l'OSM mais il n'a aucun effet sur celle induite par les autres

cytokines de la famille telles que le LIF ou l'IL-6. L'antagoniste s'est également révélé efficace dans des tests d'inhibition de la prolifération cellulaire. En parallèle, nous avons généré un antagoniste de l'OSM murine sur le même modèle structural. L'antagoniste de l'OSM humaine étant sans effet sur la protéine murine, de manière similaire l'antagoniste de l'OSM murine s'est révélé sans effet sur la cytokine humaine. Ces résultats ont été observés à partir d'expériences de coprécipitations et de signalisation cellulaire. Nous disposons ainsi d'un outil afin de réaliser des études *in vivo*. En effet, il a été montré que l'OSM semble être impliquée dans différentes pathologies telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde ou le psoriasis et il serait intéressant de tester l'antagoniste dans ces modèles de pathologies chez la souris. Des tests préliminaires ont été réalisés, à Poitiers dans l'équipe du Dr. Jean-Claude Lecron, chez la souris dans un modèle de cicatrisation où l'OSM serait impliquée. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires avant de conclure sur l'activité de l'antagoniste dans ce modèle.

Nous avons réalisé une étude similaire portant sur la génération d'un antagoniste de l'IL-31. Ce dernier est constitué des domaines CBD et « Ig-like » de l'OSMR ainsi que du domaine CBD de GPL. Nous avons démontré, par des expériences de co-précipitation, une interaction spécifique de l'antagoniste avec l'IL-31, sans réactivité croisée avec l'OSM. Des expériences de signalisation et de prolifération cellulaires ont confirmé cette spécificité tout en mettant en évidence le fort potentiel antagoniste de notre protéine de fusion. Nous avons ainsi validé cet antagoniste *in vitro* et, afin de réaliser des études *in vivo*, nous avons également généré un antagoniste de l'IL-31 murine. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, cette cytokine présente une grande spécificité d'espèce et il était donc nécessaire de générer cet antagoniste murin. Des expériences de co-précipitations ont confirmé l'interaction de l'antagoniste humain avec la cytokine humaine mais pas avec la cytokine murine, et inversement.

Différentes perspectives peuvent être envisagées afin de tester cet antagoniste *in vivo*. La première idée est de le tester dans des modèles de dermatite atopique chez la souris. Il existe différents modèles de cette pathologie. Une surexpression de l'IL-31 a été mise en évidence dans les souris NC/Nga lors du développement de la maladie. Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'antagoniste dans ce modèle. Nous pourrions également utiliser des modèles dans lesquels la pathologie est induite par des haptènes. Ces modèles sont intéressants car il est possible de mimer l'hétérogénéité des inflammations chroniques en modifiant les haptènes ou les souches de souris. En effet, l'utilisation de 2,4,6-trinitrochlorobenzène dans les souris Balb/c, connues pour avoir une

tendance à développer des réponses Th2, mime une dermatite atopique extrinsèque (taux d'IgE élevée). A l'inverse, l'utilisation d'oxazolone dans des souris C57/BL6, connues pour leur tendance à développer des réponses Th1, mime une dermatite atopique intrinsèque (taux d'IgE normal). L'IL-31 est une cytokine préférentiellement produite par les lymphocytes Th2 mais elle semble être impliquée dans la forme intrinsèque de la maladie. Il serait donc intéressant de tester l'antagoniste dans ces deux modèles. Ces études *in vivo* nous permettraient également de déterminer les facteurs pharmaco-cinétiques, tels que la demie-vie de nos antagonistes afin de mieux évaluer leur potentiel thérapeutique. Une autre perspective envisagée est la génération de souris transgéniques exprimant l'antagoniste de façon spécifique au niveau de la peau. Ces souris nous permettraient de mieux déterminer les rôles de l'IL-31 au niveau du système cutané.

En parallèle à l'analyse fonctionnelle de l'antagoniste de l'IL-31, nous avons également mis en évidence une nouvelle activité de cette cytokine. En effet, elle semble être impliquée dans le développement tumoral de manière similaire à l'OSM.

3. Effets cytostatiques de l'OSM et de l'IL-31 : implication de la voie de signalisation STAT4 ?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'OSM exerce des activités cytostatiques sur des lignées tumorales en particulier des mélanomes, des carcinomes de poumons, des neuroblastomes et des glioblastomes. Cet effet cytostatique implique un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 grâce à l'induction d'inhibiteurs du cycle. De plus, l'OSM peut également favoriser l'apoptose de certaines cellules tumorales telles que des ostéosarcomes (327). Cependant, le rôle de l'OSM dans le développement tumoral n'est pas encore totalement élucidé. En effet, cette cytokine pourrait également exercer des activités pro-tumorales en favorisant l'angiogénèse et le développement de métastases. D'autre part, elle favorise la prolifération des cellules de sarcome de Kaposi de patients atteints du VIH et serait ainsi impliquée dans la progression de la maladie ainsi que dans le maintien du phénotype transformé de ces cellules. La plupart de ces observations a été faite à partir d'expériences réalisées *in vitro* et finalement, il existe peu d'études *in vivo* concernant les effets de l'OSM sur le développement tumoral. Une première étude démontre les effets anti-tumorigéniques de l'OSM sur des gliomes (312). Une autre étude met en évidence que l'OSM inhibe le développement de métastases pulmonaires dans un modèle d'induction de mélanomes (369).

Enfin, une étude semble montrer l'effet bénéfique de l'OSM, utilisée en thérapie génique, dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire (370). L'ensemble de ces résultats confirme que l'OSM est un facteur à considérer en application clinique. Par conséquent, il faut approfondir les connaissances relatives à cette cytokine en particulier grâce à des études *in vivo* afin d'évaluer son potentiel thérapeutique mais également les effets secondaires éventuels.

Connaissant les propriétés cytostatiques de l'OSM et étant donné que cette dernière partage une chaîne réceptrice avec l'IL-31, nous avons évidemment émis l'hypothèse que l'IL-31 pourrait également être impliquée dans le développement tumoral. Nous avons donc testé son activité sur différentes lignées tumorales et nous avons ainsi mis en évidence son activité cytostatique en particulier sur des glioblastomes. En effet, de manière similaire à l'OSM, elle inhibe la prolifération des lignées GO-G-UVM et U87MG. De plus, elle induit également des modifications morphologiques. A l'inverse, elle n'a aucun effet sur la lignée T98G, contrairement à l'OSM qui inhibe fortement la prolifération de ces cellules. Ces effets contradictoires peuvent s'expliquer par la distribution des chaînes réceptrices. En effet, les lignées GO-G-UVM et U87MG expriment gp130, OSMR et GPL de manière équivalente. En ce qui concerne la lignée T98G, elle exprime fortement gp130 et OSMR mais très faiblement GPL. D'après des résultats préliminaires, il semble que l'effet de l'IL-31 sur la prolifération n'implique pas une apoptose des cellules mais un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, comme cela a été décrit pour l'OSM.

Au vu des données bibliographiques concernant l'implication des voies de signalisation dans l'activité cytostatique de l'OSM, nous avons émis une nouvelle hypothèse impliquant une activation de la voie STAT4. En effet, aucune voie de signalisation, décrite à ce jour comme étant activée par l'OSM, ne permet d'expliquer cette activité cytostatique. Une première étude semblait démontrer l'implication des STATs, et plus particulièrement de STAT3, dans l'activité cytostatique de l'OSM sur la lignée de mélanome A375 (305). Cependant, des études sur les gliomes réalisées par un même groupe donnent des résultats complètement contradictoires. En effet, ils suggéraient dans leur première étude que les voies de signalisation Jak/STAT et des MAPKs étaient impliquées dans l'effet cytostatique de l'OSM sur les gliomes (307). Ensuite, ils ont suggéré que ces voies n'étaient pas suffisantes pour expliquer cet effet (371). Et enfin, ils ont démontré dans une dernière étude que l'inhibition de la prolifération, induite par l'OSM dans des glioblastomes, ne dépendait ni de STAT3, ni des MAPKs (372). L'ensemble de ces observations nous a amenés à supposer

l'implication d'une voie de signalisation encore jamais décrite comme étant activée par l'OSM.

Nous avons ainsi mis en évidence que STAT4 était exprimé dans de nombreux tissus et de nombreuses lignées tumorales. Nous avons également démontré une activation de STAT4 en réponse à l'OSM mais également en réponse à l'IL-31, dans différentes lignées de glioblastomes. Cependant, ces données sont totalement nouvelles car l'expression de STAT4 est décrite à ce jour comme étant restreinte à certains tissus et particulièrement aux tissus lymphoïdes et myéloïdes. Ses principaux activateurs décrits sont l'IL-12 et l'IL-23, mais également dans une certaine mesure l'IL-2, l'IL-15, l'IL-21, l'IL-27 et les IFNs de type I. Les premières études concernant les souris déficientes en STAT4, ont démontré que ce facteur de transcription était nécessaire pour les réponses biologiques induites par l'IL-12, en particulier pour la production d'IFN- γ . Il est également impliqué dans la différenciation des lymphocytes Th1 et dans l'expression de gènes spécifiques des réponses Th1 (373). Ainsi, les souris déficientes en STAT4 sont protégées des réponses inflammatoires localisées, induites par les lymphocytes T, dans des modèles de maladies autoimmunes telles que la sclérose en plaques ou l'arthrite. A l'inverse, ces souris sont évidemment plus sensibles aux infections, en particulier bactériennes et parasitaires, du fait de leur déficience en réponses Th1. Ces résultats ont été confirmés en partie chez l'homme puisqu'il a été démontré que des patients, avec un défaut de translocation nucléaire de STAT4, présentent des infections récurrentes. La majorité des études portant sur STAT4 est donc ciblée autour de ces axes de recherche et seulement une étude à ce jour porte sur l'implication de ce facteur dans le cancer. Cette étude démontre que les souris STAT4^{-/-} sont plus susceptibles au développement de lymphomes thymiques dans un modèle par induction chimique : STAT4 jouerait donc un rôle dans le rejet de tumeurs par l'intermédiaire des lymphocytes Th1 (374). Notre hypothèse, selon laquelle les effets cytostatiques de l'OSM et de l'IL-31 sont dépendants de STAT4, rejoindrait ces observations.

Nous avons testé les cytokines de la famille de l'IL-6 et de l'IL-12 sur des lignées de glioblastomes, afin d'identifier les cytokines capables d'induire l'activation de STAT4. Ainsi, l'OSM et l'IL-31 semblent être les principales cytokines activatrices de STAT4 dans ces lignées. Nous avons ensuite observé une très forte corrélation entre l'activation de STAT4 et l'effet cytostatique induit par l'OSM et l'IL-31. En effet, lorsque ces deux cytokines activent STAT4, elles inhibent également la prolifération de cellules telles que les lignées GO-G-UVM et U87MG. En ce qui concerne la lignée T98G, seule l'OSM active STAT4 et exerce également un effet cytostatique. De plus, en étudiant l'activation de STAT3, nous n'avons pas

observé de telle corrélation. En effet, le LIF n'induit pas l'activation de STAT4 mais celle de STAT3 et il n'exerce pas d'activité cytotatique sur ces lignées. Ainsi, nous en avons déduit que l'OSM et l'IL-31 inhibent la prolifération des cellules indépendamment de l'activation de STAT3.

Dans un premier temps, nous avons souhaité confirmer l'activation de STAT4 par différentes expériences afin de s'affranchir d'une éventuelle crossréactivité avec STAT3. Ainsi, nous avons démontré l'activation de STAT4 par western-blot et également par des expériences de gène rapporteur. Afin de confirmer ces observations et d'étudier les activations de ces facteurs de transcription d'un point de vue moléculaire, nous avons étudié les tyrosines impliquées dans l'activation de STAT3 ou de STAT4 respectivement, à l'aide de récepteurs chimériques. Ces derniers sont constitués des parties extracellulaires des chaînes réceptrices α et β de l'IL-5 associées aux parties intracellulaires, de l'OSMR ou de GPL, dont les tyrosines ont été mutées en alanine. Nous avons réalisé différentes combinaisons afin de déterminer les tyrosines essentielles à l'activation de STAT3 ou de STAT4 par l'IL-31. Ainsi, nous avons démontré que les activations de STAT3 et de STAT4 ne nécessitent pas les mêmes tyrosines. En effet, l'activation de STAT3 est inhibée lorsque les tyrosines 917 et 945 de l'OSMR sont mutées ainsi que les tyrosines 683 et 721 de GPL. Ces résultats sont partiellement contradictoires avec une étude réalisée par l'équipe de Peter Heinrich dans laquelle ils ont identifié seulement la tyrosine 721 sur GPL comme principal site pour l'activation de STAT3 (351). Cependant, leur modèle est différent puisqu'ils ont étudié un hétérodimère constitué de des domaines intracellulaires de gp130 et de GPL alors que nous avons utilisé un hétérodimère constitué des domaines intracellulaires de l'OSMR et de GPL. Ainsi, notre modèle est basé sur le récepteur d'une cytokine connue, l'IL-31. A l'inverse, ils ont reconstitué un récepteur non décrit et aucune cytokine n'a été identifiée à ce jour comme ligand de ce récepteur. Par conséquent, ce récepteur n'existe peut-être pas naturellement. Concernant l'activation de STAT4 par l'IL-31, nous avons mis en évidence qu'elle nécessitait les mêmes tyrosines que STAT3 sur l'OSMR mais seulement la tyrosine 721 sur GPL.

Dans un deuxième temps, le but de l'étude était de démontrer que cette activation de STAT4 est à l'origine des effets cytotatiques de l'OSM et de l'IL-31. Pour cela, nous avons cloné STAT4 dans un vecteur d'expression afin d'induire son activation constitutive, par transfection stable, dans des lignées de glioblastomes sensibles à l'OSM ou sensibles à l'OSM et à l'IL-31. Nous avons ainsi transfecté les lignées GO-G-UVM, U87MG et T98G avec le plasmide codant pour STAT4. Nous avons alors observé que la transfection de STAT4 dans ces lignées entraînait la mort des cellules en particulier de la lignée T98G. En effet, aucun

clone exprimant le plasmide codant pour STAT4 n'a émergé. Concernant les deux autres lignées, nous avons obtenu des clones en particulier avec la lignée GO-G-UVM. Ces résultats peuvent s'expliquer par les données de PCR quantitative concernant l'expression de STAT3 et STAT4 dans ces trois lignées. En effet, ces trois lignées expriment STAT3 de manière équivalente alors que l'expression de STAT4 est différente selon les lignées. Une expression très faible de STAT4 est ainsi observée dans la lignée T98G comparée aux deux autres lignées. Ainsi, une forte expression de STAT4 dans des cellules ne l'exprimant pas ou presque pas de façon naturelle entraîne la mort des cellules. STAT4 aurait donc un rôle dans l'inhibition du développement tumoral. Cette observation a été confirmée par l'étude de la lignée GO-G-UVM transfectée avec le plasmide codant pour STAT4. En effet, cette surexpression a induit une activation constitutive de cette protéine corrélée à une importante inhibition de la prolifération de ces cellules, comparées aux cellules non transfectées. Nous envisageons actuellement de transfecter de façon transitoire les cellules avec des plasmides codant pour STAT3 ou STAT4 afin d'étudier les activités précoces de ces facteurs de transcription. En effet, STAT4 semble entraîner la mort des cellules à moyen ou à long termes, il nous faut donc étudier ses effets à court terme. Nous testerons ensuite l'effet de ces transfections transitoires sur la prolifération naturelle des cellules.

Différentes perspectives ont alors été envisagées afin d'inhiber STAT4. Sa localisation cytoplasmique et/ou nucléaire ne facilite pas l'utilisation d'anticorps neutralisants. D'après les données bibliographiques, le seul inhibiteur naturel spécifique de STAT4 est une protéine de la famille des PIAS appelée PIASx (241). En effet, il a été démontré que la surexpression de cette protéine dans les cellules Kit225 inhibe leur capacité à répondre à l'IL-12. Nous avons ainsi cloné cette protéine afin d'inhiber STAT4 et d'étudier les conséquences de cette inhibition. Les expériences sont en cours de réalisation mais des résultats préliminaires ne semblent pas confirmer la capacité de PIASx à inhiber STAT4. Nous avons donc envisagé une autre méthode afin d'inhiber STAT4 : il s'agit d'amorces anti-sens. Nous avons donc choisi des amorces anti-sens pour STAT4 mais également des amorces anti-sens pour STAT3. Les expériences sont également en cours de réalisation et d'après des résultats préliminaires, nous avons observé que l'activation de STAT3 est indispensable à la prolifération et à la survie des cellules. En effet, les primers anti-sens inhibant STAT3 induisent une très forte diminution de la prolifération des cellules. Concernant les primers anti-sens inhibant STAT4, ils n'induisent pas cet effet sur les cellules. Nous testons actuellement l'effet de ces amorces dans des expériences de prolifération afin de déterminer si le fait d'inhiber STAT4 reverse l'activité cytotatique des cytokines.

Nous envisageons d'étudier l'implication de STAT4, mais également de l'IL-31, *in vivo* dans le développement tumoral. Pour cela, nous allons utiliser un modèle d'induction de tumeurs, par injection sous-cutanée de cellules tumorales humaines, dans des souris Nude. Nous avons donc testé dans ce modèle les lignées de glioblastomes sensibles à l'IL-31, c'est-à-dire les lignées GO-G-UVM et U87MG, afin d'évaluer leur capacité à induire des tumeurs. Les deux lignées se sont révélées efficaces dans l'induction de tumeurs chez la souris. Afin d'étudier leurs effets *in vivo*, nous avons réalisé la construction de vecteurs permettant d'induire l'expression de l'IL-31, de STAT4 ou de l'OSM en réponse à la doxycycline. Ces constructions sont testées *in vitro* actuellement afin de vérifier l'induction de l'expression de ces différentes protéines dans la lignée GO-G-UVM. Nous avons choisi de tester également l'activité de l'OSM *in vivo* car une étude a préalablement démontré son activité antitumorogénique *in vivo* en utilisant le même modèle de vecteur inductible. Ainsi, nous disposerons d'un contrôle positif pour nos expériences.

Une dernière perspective envisagée est l'étude de l'implication de STAT4 dans le développement tumoral en utilisant les souris déficientes en STAT4. En effet, il serait intéressant d'utiliser un modèle d'induction de tumeurs, par exemple par induction chimique, afin de confirmer que les souris STAT4^{-/-} sont plus susceptibles au développement de tumeurs comme cela a préalablement été démontré dans un modèle de lymphome thymique (374). Cependant, il est connu que ces souris présentent une déficience en lymphocytes Th1 effecteurs qui sont importants pour la génération de lymphocytes T CD8⁺. Ces derniers sont essentiels dans les réponses immunitaires anti-tumorales. Ainsi, cette déficience pourrait également être à l'origine de la susceptibilité plus importante de ces souris à l'induction de tumeurs. Il sera donc nécessaire de déterminer le rôle exact de STAT4 dans ce développement tumoral en envisageant par exemple de rétablir une réponse Th1 fonctionnelle chez ces souris. Ces expériences nous permettraient d'évaluer la part de la réponse Th1 dans les effets anti-tumoraux médiés par STAT4 et ainsi de déterminer si l'activation de STAT4 par des cytokines exerce également un rôle direct sur les cellules tumorales en inhibant leur prolifération. Il est également possible d'envisager des expériences *in vivo* avec les primers anti-sens chez des souris sauvages. Une étude similaire a été réalisée, en injectant par voie intra-veineuse les amorces anti-sens, afin d'évaluer le potentiel thérapeutique du blocage de STAT4 chez la souris dans un modèle d'arthrite (375). Ce traitement inhibe ainsi les signes cliniques et histopathologiques de la maladie. De nombreux outils sont donc disponibles pour analyser les effets de STAT4 *in vivo* et nous permettent ainsi d'envisager une étude *in vivo* approfondie de l'implication de ce facteur de transcription dans le développement tumoral.

L'ensemble de mon travail de thèse montre donc l'implication de l'OSM et de l'IL-31 dans des pathologies cutanées, telles que le psoriasis ou la dermatite atopique, et par conséquent l'intérêt de générer des antagonistes de ces deux cytokines dans des perspectives thérapeutiques. En s'appuyant sur la connaissance des récepteurs mis en jeu, nous avons ainsi généré des antagonistes puissants et spécifiques pour ces deux cytokines. Après leur validation *in vitro*, nous envisageons actuellement de les tester *in vivo*.

L'IL-31 est une cytokine récemment identifiée et par conséquent, peu connue. Afin d'étendre les connaissances relatives à cette cytokine, nous avons identifié et cloné la protéine de rat. Nous disposons ainsi d'un nouveau modèle d'étude *in vivo* de l'IL-31. Nous avons également mis en évidence son activité cytostatique sur des lignées tumorales, de manière similaire à l'OSM, avec une implication du facteur de transcription STAT4. Cette dernière étude met en évidence de nouvelles cibles pour le développement de thérapies anti-cancéreuses et elle ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude de STAT4 en démontrant que ce facteur de transcription n'est pas restreint aux cellules hématopoïétiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bazan, J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6934-6938.
2. Bazan, J.F. 1990. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11:350-354.
3. de Vos, A.M., M. Ultsch, and A.A. Kossiakoff. 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255:306-312.
4. Hill, C.P., T.D. Osslund, and D. Eisenberg. 1993. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5167-5171.
5. Somers, W., M. Stahl, and J.S. Seehra. 1997. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *Embo J* 16:989-997.
6. Robinson, R.C., L.M. Grey, D. Staunton, H. Vankelecom, A.B. Vernallis, J.F. Moreau, D.I. Stuart, J.K. Heath, and E.Y. Jones. 1994. The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell* 77:1101-1116.
7. McDonald, N.Q., N. Panayotatos, and W.A. Hendrickson. 1995. Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *Embo J* 14:2689-2699.
8. Deller, M.C., K.R. Hudson, S. Ikemizu, J. Bravo, E.Y. Jones, and J.K. Heath. 2000. Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure Fold Des* 8:863-874.
9. Cunningham, B.C., M. Ultsch, A.M. De Vos, M.G. Mulkerrin, K.R. Clauser, and J.A. Wells. 1991. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254:821-825.
10. Cunningham, B.C., and J.A. Wells. 1993. Comparison of a structural and a functional epitope. *J Mol Biol* 234:554-563.
11. Di Marco, A., I. Gloaguen, R. Graziani, G. Paonessa, I. Saggio, K.R. Hudson, and R. Laufer. 1996. Identification of ciliary neurotrophic factor (CNTF) residues essential for leukemia inhibitory factor receptor binding and generation of CNTF receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9247-9252.
12. Hudson, K.R., A.B. Vernallis, and J.K. Heath. 1996. Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. *J Biol Chem* 271:11971-11978.
13. Plun-Favreau, H., D. Perret, C. Diveu, J. Froger, S. Chevalier, E. Lelievre, H. Gascan, and M. Chabbert. 2003. Leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1, and oncostatin M share structural binding determinants in the immunoglobulin-like domain of LIF receptor. *J Biol Chem* 278:27169-27179. Epub 22003 Apr 27121.
14. Simpson, R.J., A. Hammacher, D.K. Smith, J.M. Matthews, and L.D. Ward. 1997. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* 6:929-955.
15. Barton, V.A., M.A. Hall, K.R. Hudson, and J.K. Heath. 2000. Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex. *J Biol Chem* 275:36197-36203.
16. Perret, D., C. Guillet, G. Elson, J. Froger, H. Plun-Favreau, F. Rousseau, M. Chabbert, J.F. Gauchat, and H. Gascan. 2004. Two different contact sites are recruited by cardiotrophin-like cytokine (CLC) to generate the CLC/CLF and CLC/sCNTFRalpha composite cytokines. *J Biol Chem* 279:43961-43970.
17. Elson, G.C., P. Graber, C. Losberger, S. Herren, D. Gretener, L.N. Menoud, T.N. Wells, M.H. Kosco-Vilbois, and J.F. Gauchat. 1998. Cytokine-like factor-1, a novel

- soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol* 161:1371-1379.
18. Kurth, I., U. Horsten, S. Pflanz, H. Dahmen, A. Kuster, J. Grotzinger, P.C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 1999. Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *J Immunol* 162:1480-1487.
 19. Olivier, C., P. Auguste, M. Chabbert, E. Lelievre, S. Chevalier, and H. Gascan. 2000. Identification of a gp130 cytokine receptor critical site involved in oncostatin M response. *J Biol Chem* 275:5648-5656.
 20. Chow, D., X. He, A.L. Snow, S. Rose-John, and K.C. Garcia. 2001. Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science* 291:2150-2155.
 21. Layton, J.E., N.E. Hall, F. Connell, J. Venhorst, and H.R. Treutlein. 2001. Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem* 276:36779-36787.
 22. Boulanger, M.J., D.C. Chow, E.E. Brevnova, and K.C. Garcia. 2003. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300:2101-2104.
 23. Weissenbach, J., Y. Chernajovsky, M. Zeevi, L. Shulman, H. Soreq, U. Nir, D. Wallach, M. Perricaudet, P. Tiollais, and M. Revel. 1980. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7152-7156.
 24. Hirano, T., T. Taga, N. Nakano, K. Yasukawa, S. Kashiwamura, K. Shimizu, K. Nakajima, K.H. Pyun, and T. Kishimoto. 1985. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5490-5494.
 25. Takai, Y., G.G. Wong, S.C. Clark, S.J. Burakoff, and S.H. Herrmann. 1988. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 140:508-512.
 26. Ikebuchi, K., G.G. Wong, S.C. Clark, J.N. Ihle, Y. Hirai, and M. Ogawa. 1987. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9035-9039.
 27. Munoz-Fernandez, M.A., E. Cano, C.A. O'Donnell, J. Doyle, F.Y. Liew, and M. Fresno. 1994. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma, and interleukin-6 but not TNF-beta induce differentiation of neuroblastoma cells: the role of nitric oxide. *J Neurochem* 62:1330-1336.
 28. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621-636.
 29. Jilka, R.L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D.C. Williams, J.S. Abrams, B. Boyce, H. Broxmeyer, and S.C. Manolagas. 1992. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257:88-91.
 30. Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Kohler. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368:339-342.
 31. Poli, V., R. Balena, E. Fattori, A. Markatos, M. Yamamoto, H. Tanaka, G. Ciliberto, G.A. Rodan, and F. Costantini. 1994. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *Embo J* 13:1189-1196.
 32. Suematsu, S., T. Matsuda, K. Aozasa, S. Akira, N. Nakano, S. Ohno, J. Miyazaki, K. Yamamura, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1989. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7547-7551.

33. Campbell, I.L., C.R. Abraham, E. Masliah, P. Kemper, J.D. Inglis, M.B. Oldstone, and L. Mucke. 1993. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10061-10065.
34. Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241:825-828.
35. Yawata, H., K. Yasukawa, S. Natsuka, M. Murakami, K. Yamasaki, M. Hibi, T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *Embo J* 12:1705-1712.
36. Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58:573-581.
37. Rose-John, S., and P.C. Heinrich. 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 300 (Pt 2):281-290.
38. Peters, M., A.M. Muller, and S. Rose-John. 1998. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 92:3495-3504.
39. Rose-John, S., J. Scheller, G. Elson, and S.A. Jones. 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of leukocyte biology* 80:227-236.
40. Bettelli, E., M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8:345-350.
41. Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J.F. Schlaak, H.A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P.R. Galle, S. Rose-John, and M.F. Neurath. 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6:583-588.
42. Mitsuyama, K., S. Matsumoto, S. Rose-John, A. Suzuki, T. Hara, N. Tomiyasu, K. Handa, O. Tsuruta, H. Funabashi, J. Scheller, A. Toyonaga, and M. Sata. 2006. STAT3 activation via interleukin 6 trans-signalling contributes to ileitis in SAMP1/Yit mice. *Gut* 55:1263-1269.
43. Hurst, S.M., T.S. Wilkinson, R.M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G.M. Fuller, N. Topley, and S.A. Jones. 2001. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14:705-714.
44. Nowell, M.A., P.J. Richards, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, N. Topley, A.S. Williams, and S.A. Jones. 2003. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol* 171:3202-3209.
45. Richards, P.J., M.A. Nowell, S. Horiuchi, R.M. McLoughlin, C.A. Fielding, S. Grau, N. Yamamoto, M. Ehrmann, S. Rose-John, A.S. Williams, N. Topley, and S.A. Jones. 2006. Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 54:1662-1672.
46. Becker, C., M.C. Fantini, C. Schramm, H.A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P.R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John, and M.F. Neurath. 2004. TGF-beta suppresses

- tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21:491-501.
47. Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63:1149-1157.
 48. Yoshida, K., T. Taga, M. Saito, S. Suematsu, A. Kumanogoh, T. Tanaka, H. Fujiwara, M. Hirata, T. Yamagami, T. Nakahata, T. Hirabayashi, Y. Yoneda, K. Tanaka, W.Z. Wang, C. Mori, K. Shiota, N. Yoshida, and T. Kishimoto. 1996. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:407-411.
 49. Betz, U.A., W. Bloch, M. van den Broek, K. Yoshida, T. Taga, T. Kishimoto, K. Addicks, K. Rajewsky, and W. Muller. 1998. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J Exp Med* 188:1955-1965.
 50. Hirota, H., K. Yoshida, T. Kishimoto, and T. Taga. 1995. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4862-4866.
 51. Maione, D., E. Di Carlo, W. Li, P. Musiani, A. Modesti, M. Peters, S. Rose-John, C. Della Rocca, M. Tripodi, D. Lazzaro, R. Taub, R. Savino, and G. Ciliberto. 1998. Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *Embo J* 17:5588-5597.
 52. Moore, P.S., C. Boshoff, R.A. Weiss, and Y. Chang. 1996. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* 274:1739-1744.
 53. Burger, R., F. Neipel, B. Fleckenstein, R. Savino, G. Ciliberto, J.R. Kalden, and M. Gramatzki. 1998. Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood* 91:1858-1863.
 54. Fielding, C.A., R.M. McLoughlin, C.S. Colmont, M. Kovaleva, D.A. Harris, S. Rose-John, N. Topley, and S.A. Jones. 2005. Viral IL-6 blocks neutrophil infiltration during acute inflammation. *J Immunol* 175:4024-4029.
 55. Molden, J., Y. Chang, Y. You, P.S. Moore, and M.A. Goldsmith. 1997. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *J Biol Chem* 272:19625-19631.
 56. Paul, S.R., F. Bennett, J.A. Calvetti, K. Kelleher, C.R. Wood, R.M. O'Hara, Jr., A.C. Leary, B. Sibley, S.C. Clark, D.A. Williams, and et al. 1990. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell- derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7512-7516.
 57. Kawashima, I., J. Ohsumi, K. Mita-Honjo, K. Shimoda-Takano, H. Ishikawa, S. Sakakibara, K. Miyadai, and Y. Takiguchi. 1991. Molecular cloning of cDNA encoding adipogenesis inhibitory factor and identity with interleukin-11. *FEBS Lett* 283:199-202.
 58. Keller, D.C., X.X. Du, E.F. Srour, R. Hoffman, and D.A. Williams. 1993. Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. *Blood* 82:1428-1435.
 59. McKinley, D., Q. Wu, T. Yang-Feng, and Y.C. Yang. 1992. Genomic sequence and chromosomal location of human interleukin-11 gene (IL11). *Genomics* 13:814-819.
 60. Teramura, M., S. Kobayashi, S. Hoshino, K. Oshimi, and H. Mizoguchi. 1992. Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 79:327-331.
 61. Broudy, V.C., N.L. Lin, and K. Kaushansky. 1995. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance

- murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 85:1719-1726.
62. Yin, T.G., P. Schendel, and Y.C. Yang. 1992. Enhancement of in vitro and in vivo antigen-specific antibody responses by interleukin 11. *J Exp Med* 175:211-216.
63. Quesniaux, V.F., S.C. Clark, K. Turner, and B. Fagg. 1992. Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. *Blood* 80:1218-1223.
64. Baumann, H., and P. Schendel. 1991. Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. *J Biol Chem* 266:20424-20427.
65. Mehler, M.F., R. Rozental, M. Dougherty, D.C. Spray, and J.A. Kessler. 1993. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature* 362:62-65.
66. Zhang, Y., C. Taveggia, C. Melendez-Vasquez, S. Einheber, C.S. Raine, J.L. Salzer, C.F. Brosnan, and G.R. John. 2006. Interleukin-11 potentiates oligodendrocyte survival and maturation, and myelin formation. *J Neurosci* 26:12174-12185.
67. Girasole, G., G. Passeri, R.L. Jilka, and S.C. Manolagas. 1994. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest* 93:1516-1524.
68. Robb, L., R. Li, L. Hartley, H.H. Nandurkar, F. Koentgen, and C.G. Begley. 1998. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med* 4:303-308.
69. Kimura, R., M. Maeda, A. Arita, Y. Oshima, M. Obana, T. Ito, Y. Yamamoto, T. Mohri, T. Kishimoto, I. Kawase, Y. Fujio, and J. Azuma. 2007. Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine. *Cytokine* 38:107-115.
70. Gordon, M.S., W.J. McCaskill-Stevens, L.A. Battiato, J. Loewy, D. Loesch, E. Breeden, R. Hoffman, K.J. Beach, B. Kuca, J. Kaye, and G.W. Sledge, Jr. 1996. A phase I trial of recombinant human interleukin-11 (neumega rhIL-11 growth factor) in women with breast cancer receiving chemotherapy. *Blood* 87:3615-3624.
71. Montero, A.J., Z. Estrov, E.J. Freireich, I.F. Khouri, C.A. Koller, and R. Kurzrock. 2006. Phase II study of low-dose interleukin-11 in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia & lymphoma* 47:2049-2054.
72. Hilton, D.J., A.A. Hilton, A. Raicevic, S. Rakar, M. Harrison-Smith, N.M. Gough, C.G. Begley, D. Metcalf, N.A. Nicola, and T.A. Willson. 1994. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *Embo J* 13:4765-4775.
73. Chereil, M., M. Sorel, B. Lebeau, S. Dubois, J.F. Moreau, R. Bataille, S. Minvielle, and Y. Jacques. 1995. Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11. *Blood* 86:2534-2540.
74. Yin, T., T. Taga, M.L. Tsang, K. Yasukawa, T. Kishimoto, and Y.C. Yang. 1993. Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *J Immunol* 151:2555-2561.
75. Neddermann, P., R. Graziani, G. Ciliberto, and G. Paonessa. 1996. Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. *J Biol Chem* 271:30986-30991.
76. Nandurkar, H.H., L. Robb, D. Tarlinton, L. Barnett, F. Kontgen, and C.G. Begley. 1997. Adult mice with targeted mutation of the interleukin-11 receptor (IL11Ra) display normal hematopoiesis. *Blood* 90:2148-2159.
77. Pennica, D., K.L. King, K.J. Shaw, E. Luis, J. Rullamas, S.M. Luoh, W.C. Darbonne, D.S. Knutzon, R. Yen, K.R. Chien, and et al. 1995. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1142-1146.

78. Pennica, D., T.A. Swanson, K.J. Shaw, W.J. Kuang, C.L. Gray, B.G. Beatty, and W.I. Wood. 1996. Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization. *Cytokine* 8:183-189.
79. Pennica, D., K.J. Shaw, T.A. Swanson, M.W. Moore, D.L. Shelton, K.A. Zioncheck, A. Rosenthal, T. Taga, N.F. Paoni, and W.I. Wood. 1995. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem* 270:10915-10922.
80. Peters, M., E. Roeb, D. Pennica, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and S. Rose-John. 1995. A new hepatocyte stimulating factor: cardiotrophin-1 (CT-1). *FEBS Lett* 372:177-180.
81. Robledo, O., S. Chevalier, J. Froger, A. Barthelaix-Pouplard, D. Pennica, and H. Gascan. 1997. Regulation of interleukin 6 expression by cardiotrophin 1. *Cytokine* 9:666-671.
82. Iniguez, M., C. Berasain, E. Martinez-Anso, M. Bustos, P. Fortes, D. Pennica, M.A. Avila, and J. Prieto. 2006. Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. *J Exp Med* 203:2809-2815.
83. Bustos, M., N. Beraza, J.J. Lasarte, E. Baixeras, P. Alzuguren, T. Bordet, and J. Prieto. 2003. Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* 125:192-201.
84. Taga, T. 1996. Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J Neurochem* 67:1-10.
85. Ochiai, W., M. Yanagisawa, T. Takizawa, K. Nakashima, and T. Taga. 2001. Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells involving cardiotrophin-1-induced activation of STAT3. *Cytokine* 14:264-271.
86. Pennica, D., V. Arce, T.A. Swanson, R. Vejsada, R.A. Pollock, M. Armanini, K. Dudley, H.S. Phillips, A. Rosenthal, A.C. Kato, and C.E. Henderson. 1996. Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron* 17:63-74.
87. Oppenheim, R.W., S. Wiese, D. Prevette, M. Armanini, S. Wang, L.J. Houenou, B. Holtmann, R. Gotz, D. Pennica, and M. Sendtner. 2001. Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *J Neurosci* 21:1283-1291.
88. Marques, J.M., I. Belza, B. Holtmann, D. Pennica, J. Prieto, and M. Bustos. 2007. Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 45:639-648.
89. Jin, H., R. Yang, G.A. Keller, A. Ryan, A. Ko, D. Finkle, T.A. Swanson, W. Li, D. Pennica, W.I. Wood, and N.F. Paoni. 1996. In vivo effects of cardiotrophin-1. *Cytokine* 8:920-926.
90. Robledo, O., M. Fourcin, S. Chevalier, C. Guillet, P. Auguste, A. Pouplard-Barthelaix, D. Pennica, and H. Gascan. 1997. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem* 272:4855-4863.
91. Wollert, K.C., T. Taga, M. Saito, M. Narazaki, T. Kishimoto, C.C. Glembotski, A.B. Vernallis, J.K. Heath, D. Pennica, W.I. Wood, and K.R. Chien. 1996. Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J Biol Chem* 271:9535-9545.
92. Stockli, K.A., F. Lottspeich, M. Sendtner, P. Masiakowski, P. Carroll, R. Gotz, D. Lindholm, and H. Thoenen. 1989. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342:920-923.

93. Schooltink, H., T. Stoyan, E. Roeb, P.C. Heinrich, and S. Rose-John. 1992. Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. *FEBS Lett* 314:280-284.
94. Conover, J.C., N.Y. Ip, W.T. Poueymirou, B. Bates, M.P. Goldfarb, T.M. DeChiara, and G.D. Yancopoulos. 1993. Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells. *Development* 119:559-565.
95. Saadat, S., M. Sendtner, and H. Rohrer. 1989. Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1807-1816.
96. Adler, R., K.B. Landa, M. Manthorpe, and S. Varon. 1979. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204:1434-1436.
97. Arakawa, Y., M. Sendtner, and H. Thoenen. 1990. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* 10:3507-3515.
98. Sendtner, M., G.W. Kreutzberg, and H. Thoenen. 1990. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345:440-441.
99. Hughes, S.M., L.E. Lillien, M.C. Raff, H. Rohrer, and M. Sendtner. 1988. Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335:70-73.
100. Louis, J.C., E. Magal, S. Takayama, and S. Varon. 1993. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 259:689-692.
101. Guillet, C., P. Auguste, W. Mayo, P. Kreher, and H. Gascan. 1999. Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J Neurosci* 19:1257-1262.
102. Masu, Y., E. Wolf, B. Holtmann, M. Sendtner, G. Brem, and H. Thoenen. 1993. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365:27-32.
103. Takahashi, R., H. Yokoji, H. Misawa, M. Hayashi, J. Hu, and T. Deguchi. 1994. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet* 7:79-84.
104. Sendtner, M., K.A. Stockli, and H. Thoenen. 1992. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol* 118:139-148.
105. Sendtner, M., R. Gotz, B. Holtmann, and H. Thoenen. 1997. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17:6999-7006.
106. Bloch, J., A.C. Bachoud-Levi, N. Deglon, J.P. Lefaucheur, L. Winkel, S. Palfi, J.P. Nguyen, C. Bourdet, V. Gaura, P. Remy, P. Brugieres, M.F. Boisse, S. Baudic, P. Cesaro, P. Hantraye, P. Aebischer, and M. Peschanski. 2004. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 15:968-975.
107. Emerich, D.F., and S.R. Winn. 2004. Neuroprotective effects of encapsulated CNTF-producing cells in a rodent model of Huntington's disease are dependent on the proximity of the implant to the lesioned striatum. *Cell transplantation* 13:253-259.
108. Ogata, N., K. Ogata, H.G. Imhof, and Y. Yonekawa. 1996. Effect of CNTF on ischaemic cell damage in rat hippocampus. *Acta neurochirurgica* 138:580-583.

109. Ozog, M.A., G. Modha, J. Church, D. Slotwinska, and C.C. Naus. 2007. Co-administration of CNTF with its soluble receptor protects against neuronal death and enhances neurite outgrowth. *J Biol Chem*
110. Davis, S., T.H. Aldrich, D.M. Valenzuela, V.V. Wong, M.E. Furth, S.P. Squinto, and G.D. Yancopoulos. 1991. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59-63.
111. Ip, N.Y., S.H. Nye, T.G. Boulton, S. Davis, T. Taga, Y. Li, S.J. Birren, K. Yasukawa, T. Kishimoto, D.J. Anderson, and et al. 1992. CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* 69:1121-1132.
112. Davis, S., T.H. Aldrich, N.Y. Ip, N. Stahl, S. Scherer, T. Farruggella, P.S. DiStefano, R. Curtis, N. Panayotatos, H. Gascan, and et al. 1993. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 259:1736-1739.
113. Ip, N.Y., and G.D. Yancopoulos. 1992. Ciliary neurotrophic factor and its receptor complex. *Progress in growth factor research* 4:139-155.
114. Davis, S., T.H. Aldrich, N. Stahl, L. Pan, T. Taga, T. Kishimoto, N.Y. Ip, and G.D. Yancopoulos. 1993. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260:1805-1808.
115. Grotzinger, J., T. Kernebeck, K.J. Kallen, and S. Rose-John. 1999. IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biol Chem* 380:803-813.
116. De Serio, A., R. Graziani, R. Laufer, G. Ciliberto, and G. Paonessa. 1995. In vitro binding of ciliary neurotrophic factor to its receptors: evidence for the formation of an IL-6-type hexameric complex. *J Mol Biol* 254:795-800.
117. Boulanger, M.J., A.J. Bankovich, T. Kortemme, D. Baker, and K.C. Garcia. 2003. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Mol Cell* 12:577-589.
118. DeChiara, T.M., R. Vejsada, W.T. Poueymirou, A. Acheson, C. Suri, J.C. Conover, B. Friedman, J. McClain, L. Pan, N. Stahl, and et al. 1995. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83:313-322.
119. Elson, G.C., E. Lelievre, C. Guillet, S. Chevalier, H. Plun-Favreau, J. Froger, I. Suard, A.B. de Coignac, Y. Delneste, J.Y. Bonnefoy, J.F. Gauchat, and H. Gascan. 2000. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 3:867-872.
120. Plun-Favreau, H., G. Elson, M. Chabbert, J. Froger, O. deLapeyriere, E. Lelievre, C. Guillet, J. Hermann, J.F. Gauchat, H. Gascan, and S. Chevalier. 2001. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *Embo J* 20:1692-1703.
121. Derouet, D., F. Rousseau, F. Alfonsi, J. Froger, J. Hermann, F. Barbier, D. Perret, C. Diveu, C. Guillet, L. Preisser, A. Dumont, M. Barbado, A. Morel, O. deLapeyriere, H. Gascan, and S. Chevalier. 2004. Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4827-4832.
122. Senaldi, G., B.C. Varnum, U. Sarmiento, C. Starnes, J. Lile, S. Scully, J. Guo, G. Elliott, J. McNinch, C.L. Shaklee, D. Freeman, F. Manu, W.S. Simonet, T. Boone, and M.S. Chang. 1999. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11458-11463.

123. Shi, Y., W. Wang, P.A. Yourey, S. Gohari, D. Zukauskas, J. Zhang, S. Ruben, and R.F. Alderson. 1999. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun* 262:132-138.
124. Senaldi, G., M. Stolina, J. Guo, R. Faggioni, S. McCabe, S.A. Kaufman, G. Van, W. Xu, F.A. Fletcher, T. Boone, M.S. Chang, U. Sarmiento, and R.C. Cattley. 2002. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol* 168:5690-5698.
125. Burger, R., F. Bakker, A. Guenther, W. Baum, D. Schmidt-Arras, T. Hideshima, Y.T. Tai, R. Shringarpure, L. Catley, G. Senaldi, M. Gramatzki, and K.C. Anderson. 2003. Functional significance of novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) for human myeloma cell growth and survival. *Br J Haematol* 123:869-878.
126. Uemura, A., T. Takizawa, W. Ochiai, M. Yanagisawa, K. Nakashima, and T. Taga. 2002. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 18:1-7.
127. de Bovis, B., D. Derouet, J.F. Gauchat, G. Elson, H. Gascan, and O. Delapeyriere. 2005. clc is co-expressed with clf or cntfr in developing mouse muscles. *Cell Commun Signal* 3:1.
128. Kraves, S., and C.J. Weitz. 2006. A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci* 9:212-219.
129. Rousseau, F., J.F. Gauchat, J.G. McLeod, S. Chevalier, C. Guillet, F. Guilhot, I. Cognet, J. Froger, A.F. Hahn, P.M. Knappskog, H. Gascan, and H. Boman. 2006. Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10068-10073.
130. Alexander, W.S., S. Rakar, L. Robb, A. Farley, T.A. Willson, J.G. Zhang, L. Hartley, Y. Kikuchi, T. Kojima, H. Nomura, M. Hasegawa, M. Maeda, L. Fabri, K. Jachno, A. Nash, D. Metcalf, N.A. Nicola, and D.J. Hilton. 1999. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* 9:605-608.
131. Lelievre, E., H. Plun-Favreau, S. Chevalier, J. Froger, C. Guillet, G.C. Elson, J.F. Gauchat, and H. Gascan. 2001. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem* 276:22476-22484.
132. Forger, N.G., D. Prevette, O. deLapeyriere, B. de Bovis, S. Wang, P. Bartlett, and R.W. Oppenheim. 2003. Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci* 23:8854-8858.
133. Knappskog, P.M., J. Majewski, A. Livneh, P.T. Nilsen, J.S. Bringsli, J. Ott, and H. Boman. 2003. Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *American journal of human genetics* 72:375-383.
134. Ohno, M., J. Kohyama, M. Namihira, T. Sanosaka, J.A. Takahashi, N. Hashimoto, and K. Nakashima. 2006. Neuropoietin induces neuroepithelial cells to differentiate into astrocytes via activation of STAT3. *Cytokine* 36:17-22.
135. Tomida, M., Y. Yamamoto-Yamaguchi, and M. Hozumi. 1984. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem* 259:10978-10982.
136. Moreau, J.F., D.D. Donaldson, F. Bennett, J. Witek-Giannotti, S.C. Clark, and G.G. Wong. 1988. Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 336:690-692.

137. Gascan, H., A. Godard, C. Ferenz, J. Nault, V. Praloran, M.A. Peyrat, R. Hewick, Y. Jacques, J.F. Moreau, and J.P. Soullillou. 1989. Characterization and NH₂-terminal amino acid sequence of natural human interleukin for DA cells: leukemia inhibitory factor. Differentiation inhibitory activity secreted by a T lymphoma cell line. *J Biol Chem* 264:21509-21515.
138. Baumann, H., and G.G. Wong. 1989. Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. *J Immunol* 143:1163-1167.
139. Abe, T., M. Murakami, T. Sato, M. Kajiki, M. Ohno, and R. Kodaira. 1989. Macrophage differentiation inducing factor from human monocytic cells is equivalent to murine leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 264:8941-8945.
140. Reid, L.R., C. Lowe, J. Cornish, S.J. Skinner, D.J. Hilton, T.A. Willson, D.P. Gearing, and T.J. Martin. 1990. Leukemia inhibitory factor: a novel bone-active cytokine. *Endocrinology* 126:1416-1420.
141. Dazai, S., S. Akita, A. Hirano, M.A. Rashid, S. Naito, K. Akino, and T. Fujii. 2000. Leukemia inhibitory factor enhances bone formation in calvarial bone defect. *The Journal of craniofacial surgery* 11:513-520.
142. Malaval, L., and J.E. Aubin. 2001. Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *Journal of cellular biochemistry* Suppl 36:63-70.
143. Yamamori, T., K. Fukada, R. Aebersold, S. Korsching, M.J. Fann, and P.H. Patterson. 1989. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 246:1412-1416.
144. Smith, A.G., J.K. Heath, D.D. Donaldson, G.G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688-690.
145. Williams, R.L., D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, and N.M. Gough. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684-687.
146. Mori, M., K. Yamaguchi, and K. Abe. 1989. Purification of a lipoprotein lipase-inhibiting protein produced by a melanoma cell line associated with cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun* 160:1085-1092.
147. Escary, J.L., J. Perreau, D. Dumenil, S. Ezine, and P. Brulet. 1993. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 363:361-364.
148. Waring, P., D. Wall, R. Dauer, D. Parkin, and D. Metcalf. 1993. The effects of leukaemia inhibitory factor on platelet function. *Br J Haematol* 83:80-87.
149. Fletcher, F.A., K.A. Moore, M. Ashkenazi, P. De Vries, P.A. Overbeek, D.E. Williams, and J.W. Belmont. 1991. Leukemia inhibitory factor improves survival of retroviral vector-infected hematopoietic stem cells in vitro, allowing efficient long-term expression of vector-encoded human adenosine deaminase in vivo. *J Exp Med* 174:837-845.
150. Verfaillie, C.M. 1993. Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood* 82:2045-2053.
151. Mayer, P., K. Geissler, M. Ward, and D. Metcalf. 1993. Recombinant human leukemia inhibitory factor induces acute phase proteins and raises the blood platelet counts in nonhuman primates. *Blood* 81:3226-3233.

152. Stewart, C.L., P. Kaspar, L.J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Kontgen, and S.J. Abbondanzo. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76-79.
153. Delage, G., J.F. Moreau, J.L. Taupin, S. Freitas, E. Hambartsoumian, F. Olivennes, R. Fanchin, H. Letur-Konirsch, R. Frydman, and G. Chaouat. 1995. In-vitro endometrial secretion of human interleukin for DA cells/leukaemia inhibitory factor by explant cultures from fertile and infertile women. *Human reproduction (Oxford, England)* 10:2483-2488.
154. Laird, S.M., E.M. Tuckerman, C.F. Dalton, B.C. Dunphy, T.C. Li, and X. Zhang. 1997. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Human reproduction (Oxford, England)* 12:569-574.
155. Piccinni, M.P., L. Beloni, C. Livi, E. Maggi, G. Scarselli, and S. Romagnani. 1998. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T- helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 4:1020-1024.
156. White, C.A., J.G. Zhang, L.A. Salamonsen, M. Baca, W.D. Fairlie, D. Metcalf, N.A. Nicola, L. Robb, and E. Dimitriadis. 2007. Blocking LIF action in the uterus by using a PEGylated antagonist prevents implantation: a nonhormonal contraceptive strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19357-19362.
157. Gearing, D.P., C.J. Thut, T. VandeBos, S.D. Gimpel, P.B. Delaney, J. King, V. Price, D. Cosman, and M.P. Beckmann. 1991. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *Embo J* 10:2839-2848.
158. Gearing, D.P., M.R. Comeau, D.J. Friend, S.D. Gimpel, C.J. Thut, J. McGourty, K.K. Brasher, J.A. King, S. Gillis, B. Mosley, and et al. 1992. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255:1434-1437.
159. Ware, C.B., M.C. Horowitz, B.R. Renshaw, J.S. Hunt, D. Liggitt, S.A. Koblar, B.C. Gliniak, H.J. McKenna, T. Papayannopoulou, B. Thoma, and et al. 1995. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* 121:1283-1299.
160. Li, M., M. Sendtner, and A. Smith. 1995. Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature* 378:724-727.
161. Dagonneau, N., D. Scheffer, C. Huber, L.I. Al-Gazali, M. Di Rocco, A. Godard, J. Martinovic, A. Raas-Rothschild, S. Sigaudy, S. Unger, S. Nicole, B. Fontaine, J.L. Taupin, J.F. Moreau, A. Superti-Furga, M. Le Merrer, J. Bonaventure, A. Munnich, L. Legeai-Mallet, and V. Cormier-Daire. 2004. Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *American journal of human genetics* 74:298-305.
162. Zarling, J.M., M. Shoyab, H. Marquardt, M.B. Hanson, M.N. Liubin, and G.J. Todaro. 1986. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9739-9743.
163. Malik, N., J.C. Kallestad, N.L. Gunderson, S.D. Austin, M.G. Neubauer, V. Ochs, H. Marquardt, J.M. Zarling, M. Shoyab, C.M. Wei, and et al. 1989. Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 9:2847-2853.
164. Rose, T.M., and A.G. Bruce. 1991. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia- inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8641-8645.

165. Liu, J., N. Hadjokas, B. Mosley, Z. Estrov, M.J. Spence, and R.E. Vestal. 1998. Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. *Cytokine* 10:295-302.
166. Horn, D., W.C. Fitzpatrick, P.T. Gompper, V. Ochs, M. Bolton-Hansen, J. Zarling, N. Malik, G.J. Todaro, and P.S. Linsley. 1990. Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 2:157-165.
167. Miles, S.A., O. Martinez-Maza, A. Rezai, L. Magpantay, T. Kishimoto, S. Nakamura, S.F. Radka, and P.S. Linsley. 1992. Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells. *Science* 255:1432-1434.
168. Hara, T., K. Tamura, M.P. de Miguel, Y. Mukoyama, H. Kim, H. Kogo, P.J. Donovan, and A. Miyajima. 1998. Distinct roles of oncostatin M and leukemia inhibitory factor in the development of primordial germ cells and sertoli cells in mice. *Dev Biol* 201:144-153.
169. Gomez-Lechon, M.J. 1999. Oncostatin M: signal transduction and biological activity. *Life Sci* 65:2019-2030.
170. Chen, S.H., and E.N. Benveniste. 2004. Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:379-391.
171. Liu, J., B. Modrell, A. Aruffo, J.S. Marken, T. Taga, K. Yasukawa, M. Murakami, T. Kishimoto, and M. Shoyab. 1992. Interleukin-6 signal transducer gp130 mediates oncostatin M signaling. *J Biol Chem* 267:16763-16766.
172. Mosley, B., C. De Imus, D. Friend, N. Boiani, B. Thoma, L.S. Park, and D. Cosman. 1996. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 271:32635-32643.
173. Auguste, P., C. Guillet, M. Fourcin, C. Olivier, J. Veziers, A. Pouplard-Barthelaix, and H. Gascan. 1997. Signaling of type II oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 272:15760-15764.
174. Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki, and A. Miyajima. 2003. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102:3154-3162.
175. Dillon, S.R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Billsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S.R. Presnell, H.S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, S. Bort, S. Mudri, J.L. Kuijper, T. Bukowski, P. Shea, D.L. Dong, M. Dasovich, F.J. Grant, L. Lockwood, S.D. Levin, C. LeCiel, K. Waggie, H. Day, S. Topouzis, J. Kramer, R. Kuestner, Z. Chen, D. Foster, J. Parrish-Novak, and J.A. Gross. 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5:752-760.
176. Diveu, C., E. Lelievre, D. Perret, A.H. Lak-Hal, J. Froger, C. Guillet, S. Chevalier, F. Rousseau, A. Wesa, L. Preisser, M. Chabbert, J.F. Gauchat, A. Galy, H. Gascan, and A. Morel. 2003. GPL, a novel cytokine receptor related to GP130 and leukemia inhibitory factor receptor. *J Biol Chem* 278:49850-49859.
177. Ghilardi, N., J. Li, J.A. Hongo, S. Yi, A. Gurney, and F.J. de Sauvage. 2002. A novel type I cytokine receptor is expressed on monocytes, signals proliferation, and activates STAT-3 and STAT-5. *J Biol Chem* 277:16831-16836.
178. Broxmeyer, H.E., J. Li, G. Hangoc, S. Cooper, W. Tao, C. Mantel, B. Graham-Evans, N. Ghilardi, and F.J. de Sauvage. 2007. Regulation of myeloid progenitor cell proliferation/survival by IL-31 receptor and IL-31. *Experimental hematology* 35:78-86.
179. Perrigoue, J.G., J. Li, C. Zaph, M. Goldschmidt, P. Scott, F.J. de Sauvage, E.J. Pearce, N. Ghilardi, and D. Artis. 2007. IL-31-IL-31R interactions negatively regulate type 2 inflammation in the lung. *J Exp Med* 204:481-487.

180. Pflanz, S., J.C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, J.L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T.K. McClanahan, D.M. Gorman, J.F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick, and R.A. Kastelein. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16:779-790.
181. Pflanz, S., L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J.F. Bazan, J.H. Phillips, T.K. McClanahan, R. de Waal Malefyt, and R.A. Kastelein. 2004. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172:2225-2231.
182. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R.A. Kastelein. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19:641-644.
183. Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.
184. Cua, D.J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein, and J.D. Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
185. Stumhofer, J.S., A. Laurence, E.H. Wilson, E. Huang, C.M. Tato, L.M. Johnson, A.V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C.J. Saris, J.J. O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst, and C.A. Hunter. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7:937-945.
186. Yoshimura, T., A. Takeda, S. Hamano, Y. Miyazaki, I. Kinjyo, T. Ishibashi, A. Yoshimura, and H. Yoshida. 2006. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol* 177:5377-5385.
187. Batten, M., J. Li, S. Yi, N.M. Kljavin, D.M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F.J. de Sauvage, and N. Ghilardi. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7:929-936.
188. Villarino, A., L. Hibbert, L. Lieberman, E. Wilson, T. Mak, H. Yoshida, R.A. Kastelein, C. Saris, and C.A. Hunter. 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19:645-655.
189. Chen, Q., N. Ghilardi, H. Wang, T. Baker, M.H. Xie, A. Gurney, I.S. Grewal, and F.J. de Sauvage. 2000. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407:916-920.
190. Sprecher, C.A., F.J. Grant, J.W. Baumgartner, S.R. Presnell, S.K. Schrader, T. Yamagiwa, T.E. Whitmore, P.J. O'Hara, and D.F. Foster. 1998. Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 246:82-90.
191. Amadi-Obi, A., C.R. Yu, X. Liu, R.M. Mahdi, G.L. Clarke, R.B. Nussenblatt, I. Gery, Y.S. Lee, and C.E. Egwuagu. 2007. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13:711-718.
192. Batten, M., and N. Ghilardi. 2007. The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 85:661-672.
193. Wolf, S.F., P.A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, R.M. Hewick, and et al. 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell

- stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 146:3074-3081.
194. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J.C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J.S. Abrams, K.W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715-725.
195. Devergne, O., M. Birkenbach, and E. Kieff. 1997. Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12041-12046.
196. Niedbala, W., X.Q. Wei, B. Cai, A.J. Hueber, B.P. Leung, I.B. McInnes, and F.Y. Liew. 2007. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* 37:3021-3029.
197. Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
198. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133-146.
199. Parham, C., M. Chirica, J. Timans, E. Vaisberg, M. Travis, J. Cheung, S. Pflanz, R. Zhang, K.P. Singh, F. Vega, W. To, J. Wagner, A.M. O'Farrell, T. McClanahan, S. Zurawski, C. Hannum, D. Gorman, D.M. Rennick, R.A. Kastelein, R. de Waal Malefyt, and K.W. Moore. 2002. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 168:5699-5708.
200. Yoshida, H., S. Hamano, G. Senaldi, T. Covey, R. Faggioni, S. Mu, M. Xia, A.C. Wakeham, H. Nishina, J. Potter, C.J. Saris, and T.W. Mak. 2001. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. *Immunity* 15:569-578.
201. Villarino, A.V., and C.A. Hunter. 2004. Biology of recently discovered cytokines: discerning the pro- and anti-inflammatory properties of interleukin-27. *Arthritis Res Ther* 6:225-233.
202. Ihle, J.N., and I.M. Kerr. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11:69-74.
203. Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
204. Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260:1808-1810.
205. Haan, C., P.C. Heinrich, and I. Behrmann. 2002. Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *Biochem J* 361:105-111.
206. Murakami, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga, and T. Kishimoto. 1991. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11349-11353.
207. Gauzzi, M.C., G. Barbieri, M.F. Richter, G. Uze, L. Ling, M. Fellous, and S. Pellegrini. 1997. The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon

- alpha receptor 1, a component of the interferon alpha/beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11839-11844.
208. Ragimbeau, J., E. Dondi, A. Alcover, P. Eid, G. Uze, and S. Pellegrini. 2003. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *Embo J* 22:537-547.
 209. Radtke, S., H.M. Hermanns, C. Haan, H. Schmitz-Van De Leur, H. Gascan, P.C. Heinrich, and I. Behrmann. 2002. Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J Biol Chem* 277:11297-11305.
 210. Huang, L.J., S.N. Constantinescu, and H.F. Lodish. 2001. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 8:1327-1338.
 211. Stahl, N., T.J. Farruggella, T.G. Boulton, Z. Zhong, J.E. Darnell, Jr., and G.D. Yancopoulos. 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine- based motifs in cytokine receptors. *Science* 267:1349-1353.
 212. Ihle, J.N. 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature* 377:591-594.
 213. Zhong, Z., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr. 1994. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4806-4810.
 214. Yamanaka, Y., K. Nakajima, T. Fukada, M. Hibi, and T. Hirano. 1996. Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. *Embo J* 15:1557-1565.
 215. Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334:297-314.
 216. Shuai, K., C.M. Horvath, L.H. Huang, S.A. Qureshi, D. Cowburn, and J.E. Darnell, Jr. 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76:821-828.
 217. Heim, M.H., I.M. Kerr, G.R. Stark, and J.E. Darnell, Jr. 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science (New York, N.Y)* 267:1347-1349.
 218. Zhang, T., W.H. Kee, K.T. Seow, W. Fung, and X. Cao. 2000. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol Cell Biol* 20:7132-7139.
 219. Zhang, X., J. Blenis, H.C. Li, C. Schindler, and S. Chen-Kiang. 1995. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 267:1990-1994.
 220. Akira, S., Y. Nishio, M. Inoue, X.J. Wang, S. Wei, T. Matsusaka, K. Yoshida, T. Sudo, M. Naruto, and T. Kishimoto. 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91- related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77:63-71.
 221. O'Brien, C.A., and S.C. Manolagas. 1997. Isolation and characterization of the human gp130 promoter. Regulation by STATs. *J Biol Chem* 272:15003-15010.
 222. Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82:241-250.
 223. Hermanns, H.M., S. Radtke, F. Schaper, P.C. Heinrich, and I. Behrmann. 2000. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 275:40742-40748.
 224. Chang, L., and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.

225. Zauberman, A., D. Zipori, M. Krupsky, and R. Ben-Levy. 1999. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 18:3886-3893.
226. Gotoh, N., M. Toyoda, and M. Shibuya. 1997. Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from Ras/mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol* 17:1824-1831.
227. Gotoh, N., A. Tojo, and M. Shibuya. 1996. A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residues 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *Embo J* 15:6197-6204.
228. Gu, J., M. Tamura, R. Pankov, E.H. Danen, T. Takino, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 1999. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* 146:389-403.
229. Collins, L.R., W.A. Ricketts, L. Yeh, and D. Cheresch. 1999. Bifurcation of cell migratory and proliferative signaling by the adaptor protein Shc. *J Cell Biol* 147:1561-1568.
230. Pelicci, G., S. Giordano, Z. Zhen, A.E. Salcini, L. Lanfrancone, A. Bardelli, G. Panayotou, M.D. Waterfield, C. Ponzetto, P.G. Pelicci, and et al. 1995. The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* 10:1631-1638.
231. Boulton, T.G., N. Stahl, and G.D. Yancopoulos. 1994. Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem* 269:11648-11655.
232. Hof, P., S. Pluskey, S. Dhe-Paganon, M.J. Eck, and S.E. Shoelson. 1998. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92:441-450.
233. Lechleider, R.J., S. Sugimoto, A.M. Bennett, A.S. Kashishian, J.A. Cooper, S.E. Shoelson, C.T. Walsh, and B.G. Neel. 1993. Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor. *J Biol Chem* 268:21478-21481.
234. Sugimoto, S., T.J. Wandless, S.E. Shoelson, B.G. Neel, and C.T. Walsh. 1994. Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 269:13614-13622.
235. Pluskey, S., T.J. Wandless, C.T. Walsh, and S.E. Shoelson. 1995. Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J Biol Chem* 270:2897-2900.
236. Lu, W., D. Gong, D. Bar-Sagi, and P.A. Cole. 2001. Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol Cell* 8:759-769.
237. Lehmann, U., J. Schmitz, M. Weissenbach, R.M. Sobota, M. Hortner, K. Friederichs, I. Behrmann, W. Tsiaris, A. Sasaki, J. Schneider-Mergener, A. Yoshimura, B.G. Neel, P.C. Heinrich, and F. Schaper. 2003. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 278:661-671.
238. Shuai, K., and B. Liu. 2005. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5:593-605.
239. Chung, C.D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta, and K. Shuai. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278:1803-1805.

240. Liu, B., J. Liao, X. Rao, S.A. Kushner, C.D. Chung, D.D. Chang, and K. Shuai. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10626-10631.
241. Arora, T., B. Liu, H. He, J. Kim, T.L. Murphy, K.M. Murphy, R.L. Modlin, and K. Shuai. 2003. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278:21327-21330.
242. Liu, B., M. Gross, J. ten Hoeve, and K. Shuai. 2001. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3203-3207.
243. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7:454-465.
244. Blanchard, F., Y. Wang, E. Kinzie, L. Duplomb, A. Godard, and H. Baumann. 2001. Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 276:47038-47045.
245. Starr, R., T.A. Willson, E.M. Viney, L.J. Murray, J.R. Rayner, B.J. Jenkins, T.J. Gonda, W.S. Alexander, D. Metcalf, N.A. Nicola, and D.J. Hilton. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-921.
246. Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira, and T. Kishimoto. 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387:924-929.
247. Magrangeas, F., O. Boisteau, S. Denis, Y. Jacques, and S. Minvielle. 2001. Negative cross-talk between interleukin-3 and interleukin-11 is mediated by suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3). *Biochem J* 353:223-230.
248. Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J.N. Ihle, and A. Yoshimura. 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J* 18:1309-1320.
249. Schmitz, J., M. Weissenbach, S. Haan, P.C. Heinrich, and F. Schaper. 2000. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 275:12848-12856.
250. Nicholson, S.E., D. De Souza, L.J. Fabri, J. Corbin, T.A. Willson, J.G. Zhang, A. Silva, M. Asimakis, A. Farley, A.D. Nash, D. Metcalf, D.J. Hilton, N.A. Nicola, and M. Baca. 2000. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6493-6498.
251. Nicholson, S.E., T.A. Willson, A. Farley, R. Starr, J.G. Zhang, M. Baca, W.S. Alexander, D. Metcalf, D.J. Hilton, and N.A. Nicola. 1999. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *Embo J* 18:375-385.
252. Verdier, F., S. Chretien, O. Muller, P. Varlet, A. Yoshimura, S. Gisselbrecht, C. Lacombe, and P. Mayeux. 1998. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* 273:28185-28190.
253. Verdier, F., P. Walrafen, N. Hubert, S. Chretien, S. Gisselbrecht, C. Lacombe, and P. Mayeux. 2000. Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem* 275:18375-18381.
254. Wang, Y., and G.M. Fuller. 1994. Phosphorylation and internalization of gp130 occur after IL-6 activation of Jak2 kinase in hepatocytes. *Mol Biol Cell* 5:819-828.

255. Dittrich, E., C.R. Haft, L. Muys, P.C. Heinrich, and L. Graeve. 1996. A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J Biol Chem* 271:5487-5494.
256. Thiel, S., I. Behrmann, A. Timmermann, H. Dahmen, G. Muller-Newen, F. Schaper, J. Tavernier, V. Pitard, P.C. Heinrich, and L. Graeve. 1999. Identification of a Leu-Ile internalization motif within the cytoplasmic domain of the leukaemia inhibitory factor receptor. *Biochem J* 339 (Pt 1):15-19.
257. Gibson, R.M., W.P. Schiemann, L.B. Prichard, J.M. Reno, L.H. Ericsson, and N.M. Nathanson. 2000. Phosphorylation of human gp130 at Ser-782 adjacent to the Di-leucine internalization motif. Effects on expression and signaling. *J Biol Chem* 275:22574-22582.
258. Ameglio, F., C. Bonifati, M. Fazio, A. Mussi, E. Trento, P. Cordial Fei, P. Donati, F. Pimpinelli, L. D'Auria, and M. Carducci. 1997. Interleukin-11 production is increased in organ cultures of lesional skin of patients with active plaque-type psoriasis as compared with nonlesional and normal skin. Similarity to interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8. *Arch Dermatol Res* 289:399-403.
259. Bonifati, C., A. Mussi, L. D'Auria, M. Carducci, E. Trento, P. Cordiali-Fei, and F. Ameglio. 1998. Spontaneous release of leukemia inhibitory factor and oncostatin-M is increased in supernatants of short-term organ cultures from lesional psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 290:9-13.
260. Tran, T.A., J.S. Ross, C.E. Sheehan, and J.A. Carlson. 2000. Comparison of oncostatin M expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 13:427-432.
261. Finelt, N., A. Gazel, S. Gorelick, and M. Blumenberg. 2005. Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to Oncostatin-M. *Cytokine* 31:305-313.
262. Gazel, A., M. Rosdy, B. Bertino, C. Tornier, F. Sahuc, and M. Blumenberg. 2006. A characteristic subset of psoriasis-associated genes is induced by oncostatin-M in reconstituted epidermis. *J Invest Dermatol* 126:2647-2657.
263. Boniface, K., C. Diveu, F. Morel, N. Pedretti, J. Froger, E. Ravon, M. Garcia, E. Venereau, L. Preisser, E. Guignouard, G. Guillet, G. Dagregorio, J. Pene, J.P. Moles, H. Yssel, S. Chevalier, F.X. Bernard, H. Gascan, and J.C. Lecron. 2007. Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol* 178:4615-4622.
264. Modur, V., M.J. Feldhaus, A.S. Weyrich, D.L. Jicha, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre. 1997. Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest* 100:158-168.
265. Sano, S., K.S. Chan, S. Carbajal, J. Clifford, M. Peavey, K. Kiguchi, S. Itami, B.J. Nickoloff, and J. DiGiovanni. 2005. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 11:43-49.
266. Gearing, A.J., N.J. Fincham, C.R. Bird, M. Wadhwa, A. Meager, J.E. Cartwright, and R.D. Camp. 1990. Cytokines in skin lesions of psoriasis. *Cytokine* 2:68-75.
267. Arita, K., A.P. South, G. Hans-Filho, T.H. Sakuma, J. Lai-Cheong, S. Clements, M. Odashiro, D.N. Odashiro, G. Hans-Neto, N.R. Hans, M.V. Holder, B.S. Bhogal, S.T. Hartshorne, M. Akiyama, H. Shimizu, and J.A. McGrath. 2008. Oncostatin M receptor-beta mutations underlie familial primary localized cutaneous amyloidosis. *American journal of human genetics* 82:73-80.
268. Leung, D.Y., and T. Bieber. 2003. Atopic dermatitis. *Lancet* 361:151-160.

269. Bilsborough, J., D.Y. Leung, M. Maurer, M. Howell, M. Boguniewicz, L. Yao, H. Storey, C. LeCiel, B. Harder, and J.A. Gross. 2006. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 117:418-425.
270. Santamaria Babi, L.F., L.J. Picker, M.T. Perez Soler, K. Drzimalla, P. Flohr, K. Blaser, and C. Hauser. 1995. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 181:1935-1940.
271. Takaoka, A., I. Arai, M. Sugimoto, Y. Honma, N. Futaki, A. Nakamura, and S. Nakaike. 2006. Involvement of IL-31 on scratching behavior in NC/Nga mice with atopic-like dermatitis. *Experimental dermatology* 15:161-167.
272. Takaoka, A., I. Arai, M. Sugimoto, A. Yamaguchi, M. Tanaka, and S. Nakaike. 2005. Expression of IL-31 gene transcripts in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *European journal of pharmacology* 516:180-181.
273. Sonkoly, E., A. Muller, A.I. Lauerma, A. Pivarsci, H. Soto, L. Kemeny, H. Alenius, M.C. Dieu-Nosjean, S. Meller, J. Rieker, M. Steinhoff, T.K. Hoffmann, T. Ruzicka, A. Zlotnik, and B. Homey. 2006. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 117:411-417.
274. Neis, M.M., B. Peters, A. Dreuw, J. Wenzel, T. Bieber, C. Mauch, T. Krieg, S. Stanzel, P.C. Heinrich, H.F. Merk, A. Bosio, J.M. Baron, and H.M. Hermanns. 2006. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 118:930-937.
275. Schulz, F., I. Marenholz, R. Folster-Holst, C. Chen, A. Sternjak, R. Baumgrass, J. Esparza-Gordillo, C. Gruber, R. Nickel, S. Schreiber, M. Stoll, M. Kurek, F. Ruschendorf, N. Hubner, U. Wahn, and Y.A. Lee. 2007. A common haplotype of the IL-31 gene influencing gene expression is associated with nonatopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 120:1097-1102.
276. Chattopadhyay, S., E. Tracy, P. Liang, O. Robledo, S. Rose-John, and H. Baumann. 2007. Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 282:3014-3026.
277. Ip, W.K., C.K. Wong, M.L. Li, P.W. Li, P.F. Cheung, and C.W. Lam. 2007. Interleukin-31 induces cytokine and chemokine production from human bronchial epithelial cells through activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways: implications for the allergic response. *Immunology* 122:532-541.
278. Lei, Z., G. Liu, Q. Huang, M. Lv, R. Zu, G.M. Zhang, Z.H. Feng, and B. Huang. 2007. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy*
279. Grossman, R.M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D.P. Murphy, L.T. May, T.S. Kupper, P.B. Sehgal, and A.B. Gottlieb. 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6367-6371.
280. Oyama, N., M. Sekimata, Y. Nihei, K. Iwatsuki, Y. Homma, and F. Kaneko. 1998. Different growth properties in response to epidermal growth factor and interleukin-6 of primary keratinocytes derived from normal and psoriatic lesional skin. *Journal of dermatological science* 16:120-128.
281. Sawamura, D., X. Meng, S. Ina, M. Sato, K. Tamai, K. Hanada, and I. Hashimoto. 1998. Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes. *J Immunol* 161:5633-5639.

282. Vassar, R., and E. Fuchs. 1991. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF-alpha during epidermal development and differentiation. *Genes & development* 5:714-727.
283. Sato, M., D. Sawamura, S. Ina, T. Yaguchi, K. Hanada, and I. Hashimoto. 1999. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Arch Dermatol Res* 291:400-404.
284. Turksen, K., T. Kupper, L. Degenstein, I. Williams, and E. Fuchs. 1992. Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5068-5072.
285. Elkayam, O., I. Yaron, I. Shirazi, M. Yaron, and D. Caspi. 2000. Serum levels of IL-10, IL-6, IL-1ra, and sIL-2R in patients with psoriatic arthritis. *Rheumatology international* 19:101-105.
286. Neuner, P., A. Urbanski, F. Trautinger, A. Moller, R. Kirnbauer, A. Kapp, E. Schopf, T. Schwarz, and T.A. Luger. 1991. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 97:27-33.
287. Kirnbauer, R., A. Kock, P. Neuner, E. Forster, J. Krutmann, A. Urbanski, E. Schauer, J.C. Ansel, T. Schwarz, and T.A. Luger. 1991. Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol* 96:484-489.
288. Paglia, D., S. Kondo, K.M. Ng, D.N. Sauder, and R.C. McKenzie. 1996. Leukaemia inhibitory factor is expressed by normal human keratinocytes in vitro and in vivo. *The British journal of dermatology* 134:817-823.
289. McKenzie, R.C., D. Paglia, S. Kondo, and D.N. Sauder. 1996. A novel endogenous mediator of cutaneous inflammation: leukemia inhibitory factor. *Acta dermato-venereologica* 76:111-114.
290. Zhu, M., K. Oishi, S.C. Lee, and P.H. Patterson. 2001. Studies using leukemia inhibitory factor (LIF) knockout mice and a LIF adenoviral vector demonstrate a key anti-inflammatory role for this cytokine in cutaneous inflammation. *J Immunol* 166:2049-2054.
291. McKenzie, R.C., and J. Szepietowski. 2004. Cutaneous leukemia inhibitory factor and its potential role in the development of skin tumors. *Dermatol Surg* 30:279-290.
292. Szepietowski, J., C. Walker, J.A. Hunter, and R.C. McKenzie. 2001. Elevated leukaemia inhibitory factor (LIF) expression in lesional psoriatic skin: correlation with interleukin (IL)-8 expression. *The Journal of dermatology* 28:115-122.
293. Szepietowski, J.C., R.C. McKenzie, S.G. Keohane, C. Walker, R.D. Aldridge, and J.A. Hunter. 1997. Leukaemia inhibitory factor: induction in the early phase of allergic contact dermatitis. *Contact dermatitis* 36:21-25.
294. Hu, J., S. Ono, H. Katayama, T. Imai, N. Shimizu, and H. Nakagawa. 2000. Leukemia inhibitory factor induces epidermal hyperplasia in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Invest Dermatol* 115:486-492.
295. Komine, M., I.M. Freedberg, and M. Blumenberg. 1996. Regulation of epidermal expression of keratin K17 in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 107:569-575.
296. Markey, A.C., E.B. Lane, D.M. Macdonald, and I.M. Leigh. 1992. Keratin expression in basal cell carcinomas. *The British journal of dermatology* 126:154-160.
297. Toda, M., D.Y. Leung, S. Molet, M. Boguniewicz, R. Taha, P. Christodoulopoulos, T. Fukuda, J.A. Elias, and Q.A. Hamid. 2003. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol* 111:875-881.

298. Trepicchio, W.L., M. Ozawa, I.B. Walters, T. Kikuchi, P. Gilleaudeau, J.L. Bliss, U. Schwertschlag, A.J. Dorner, and J.G. Krueger. 1999. Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesions. *J Clin Invest* 104:1527-1537.
299. Lukaszewicz, M., B. Mroczo, and M. Szmitkowski. 2007. [Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease]. *Polskie archiwum medycyny wewnetrznej* 117:247-251.
300. Duluc, D., Y. Delneste, F. Tan, M.P. Moles, L. Grimaud, J. Lenoir, L. Preisser, I. Anegon, L. Catala, N. Ifrah, P. Descamps, E. Gamelin, H. Gascan, M. Hebbbar, and P. Jeannin. 2007. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110:4319-4330.
301. Burg, C., Y. Patry, J. Le Pendu, M. Moreau, L. Tesson, A. Godard, J.P. Soulillou, K. Meflah, and I. Anegon. 1995. Leukaemia Inhibitory Factor derived from rat colon carcinoma cells increases host susceptibility to tumour growth. *Cytokine* 7:784-792.
302. Auernhammer, C.J., and S. Melmed. 2000. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocrine reviews* 21:313-345.
303. Halfter, H., R. Lotfi, R. Westermann, P. Young, E.B. Ringelstein, and F.T. Stogbauer. 1998. Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth factors (Chur, Switzerland)* 15:135-147.
304. Bellido, T., C.A. O'Brien, P.K. Roberson, and S.C. Manolagas. 1998. Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 273:21137-21144.
305. Kortylewski, M., P.C. Heinrich, A. Mackiewicz, U. Schniertshauer, U. Klingmuller, K. Nakajima, T. Hirano, F. Horn, and I. Behrmann. 1999. Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 18:3742-3753.
306. Hutt, J.A., and J.W. DeWille. 2002. Oncostatin M induces growth arrest of mammary epithelium via a CCAAT/enhancer-binding protein delta-dependent pathway. *Mol Cancer Ther* 1:601-610.
307. Halfter, H., M. Friedrich, A. Resch, M. Kullmann, F. Stogbauer, E.B. Ringelstein, and L. Hengst. 2006. Oncostatin M induces growth arrest by inhibition of Skp2, Cks1, and cyclin A expression and induced p21 expression. *Cancer research* 66:6530-6539.
308. Chen, S.H., G.Y. Gillespie, and E.N. Benveniste. 2006. Divergent effects of oncostatin M on astroglia cells: influence on cell proliferation, invasion, and expression of matrix metalloproteinases. *Glia* 53:191-200.
309. Halfter, H., M. Friedrich, C. Postert, E.B. Ringelstein, and F. Stogbauer. 1999. Activation of Jak-Stat and MAPK2 pathways by oncostatin M leads to growth inhibition of human glioma cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 1:109-116.
310. Repovic, P., C.Y. Fears, C.L. Gladson, and E.N. Benveniste. 2003. Oncostatin-M induction of vascular endothelial growth factor expression in astroglia cells. *Oncogene* 22:8117-8124.
311. Vasse, M., J. Pourtau, V. Trochon, M. Muraine, J.P. Vannier, H. Lu, J. Soria, and C. Soria. 1999. Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19:1835-1842.
312. Friedrich, M., N. Hoss, F. Stogbauer, V. Senner, W. Paulus, E.B. Ringelstein, and H. Halfter. 2001. Complete inhibition of in vivo glioma growth by oncostatin M. *J Neurochem* 76:1589-1592.

313. Heymann, D., A. Godard, S. Raheer, S. Ringear, D. Lassort, F. Blanchard, and J. Harb. 1995. Human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor and oncostatin M enhance membrane expression of intercellular adhesion molecule-1 on melanoma cells but not the shedding of its soluble form. *Cytokine* 7:111-117.
314. Johnson, J.P., B.G. Stade, B. Holzmann, W. Schwable, and G. Riethmuller. 1989. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:641-644.
315. Vanky, F., P. Wang, M. Patarroyo, and E. Klein. 1990. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens on human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes in vitro. *Cancer Immunol Immunother* 31:19-27.
316. Heymann, D., J. Harb, S. Ringear, F. Blanchard, D. Lassort, S. Raheer, and A. Godard. 1995. Upmodulation of alpha v beta 1 integrin expression on human tumor cells by human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor and oncostatin M: correlation with increased cell adhesion on fibronectin. *J Cell Biochem* 58:305-314.
317. Lu, C., J.W. Rak, H. Kobayashi, and R.S. Kerbel. 1993. Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer research* 53:2708-2711.
318. Lacreusette, A., J.M. Nguyen, M.C. Pandolfino, A. Khammari, B. Dreno, Y. Jacques, A. Godard, and F. Blanchard. 2007. Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 26:881-892.
319. Douglas, A.M., G.A. Goss, R.L. Sutherland, D.J. Hilton, M.C. Berndt, N.A. Nicola, and C.G. Begley. 1997. Expression and function of members of the cytokine receptor superfamily on breast cancer cells. *Oncogene* 14:661-669.
320. Douglas, A.M., S.L. Grant, G.A. Goss, D.R. Clouston, R.L. Sutherland, and C.G. Begley. 1998. Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer* 75:64-73.
321. Holzer, R.G., R.E. Ryan, M. Tommack, E. Schlekeway, and C.L. Jorcyk. 2004. Oncostatin M stimulates the detachment of a reservoir of invasive mammary carcinoma cells: role of cyclooxygenase-2. *Clinical & experimental metastasis* 21:167-176.
322. Jorcyk, C.L., R.G. Holzer, and R.E. Ryan. 2006. Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine* 33:323-336.
323. Nair, B.C., A.L. DeVico, S. Nakamura, T.D. Copeland, Y. Chen, A. Patel, T. O'Neil, S. Oroszlan, R.C. Gallo, and M.G. Sarngadharan. 1992. Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M. *Science* 255:1430-1432.
324. Miles, S.A., O. Martinez-Maza, A. Rezai, L. Magpantay, T. Kishimoto, S. Nakamura, S.F. Radka, and P.S. Linsley. 1992. Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells. *Science* 255:1432-1434.
325. Murakami-Mori, K., T. Taga, T. Kishimoto, and S. Nakamura. 1995. AIDS-associated Kaposi's sarcoma (KS) cells express oncostatin M (OM)-specific receptor but not leukemia inhibitory factor/OM receptor or interleukin-6 receptor. Complete block of OM-induced KS cell growth and OM binding by anti-gp130 antibodies. *J Clin Invest* 96:1319-1327.
326. Auernhammer, C.J., F. Dorn, G. Vlotides, S. Hengge, F.B. Kopp, G. Spoettl, N. Cengic, D. Engelhardt, and M.M. Weber. 2004. The oncostatin M receptor/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cells. *The Journal of endocrinology* 180:479-486.

327. Chipoy, C., B. Brounais, V. Trichet, S. Battaglia, M. Berreur, L. Oliver, P. Juin, F. Redini, D. Heymann, and F. Blanchard. 2007. Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53. *Oncogene* 26:6653-6664.
328. Jilka, R.L., R.S. Weinstein, T. Bellido, A.M. Parfitt, and S.C. Manolagas. 1998. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13:793-802.
329. Calo, V., M. Migliavacca, V. Bazan, M. Macaluso, M. Buscemi, N. Gebbia, and A. Russo. 2003. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 197:157-168.
330. Quesnelle, K.M., A.L. Boehm, and J.R. Grandis. 2007. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J Cell Biochem* 102:311-319.
331. Nishimoto, N., and T. Kishimoto. 2004. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 4:386-391.
332. Lust, J.A., K.A. Donovan, M.P. Kline, P.R. Greipp, R.A. Kyle, and N.J. Maihle. 1992. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 4:96-100.
333. Mullberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P.C. Heinrich, and S. Rose-John. 1994. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol* 152:4958-4968.
334. Mullberg, J., E. Dittrich, L. Graeve, C. Gerhartz, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, P.C. Heinrich, and S. Rose-John. 1993. Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett* 332:174-178.
335. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med* 170:1409-1414.
336. Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga, and T. Kishimoto. 1992. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J Immunol* 148:2175-2180.
337. Gaillard, J.P., R. Bataille, H. Brailly, C. Zuber, K. Yasukawa, M. Attal, N. Maruo, T. Taga, T. Kishimoto, and B. Klein. 1993. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol* 23:820-824.
338. Weis, J., D.C. Lie, U. Ragoss, S.L. Zuchner, J.M. Schroder, G. Karpati, T. Farruggella, N. Stahl, G.D. Yancopoulos, and P.S. DiStefano. 1998. Increased expression of CNTF receptor alpha in denervated human skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:850-857.
339. Layton, M.J., B.A. Cross, D. Metcalf, L.D. Ward, R.J. Simpson, and N.A. Nicola. 1992. A major binding protein for leukemia inhibitory factor in normal mouse serum: identification as a soluble form of the cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8616-8620.
340. Pitard, V., V. Lorgeot, J.L. Taupin, Y. Aubard, V. Praloran, and J.F. Moreau. 1998. The presence in human serum of a circulating soluble leukemia inhibitory factor receptor (sgp190) and its evolution during pregnancy. *Eur Cytokine Netw* 9:599-605.
341. Curtis, D.J., D.J. Hilton, B. Roberts, L. Murray, N. Nicola, and C.G. Begley. 1997. Recombinant soluble interleukin-11 (IL-11) receptor alpha-chain can act as an IL-11 antagonist. *Blood* 90:4403-4412.
342. Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G.D. Yancopoulos, T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 82:1120-1126.

343. Muller-Newen, G., A. Kuster, U. Hemmann, R. Keul, U. Horsten, A. Martens, L. Graeve, J. Wijdenes, and P.C. Heinrich. 1998. Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol* 161:6347-6355.
344. Althoff, K., J. Mullberg, D. Aasland, N. Voltz, K. Kallen, J. Grotzinger, and S. Rose-John. 2001. Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem J* 353:663-672.
345. Ashkenazi, A., S.A. Marsters, D.J. Capon, S.M. Chamow, I.S. Figari, D. Pennica, D.V. Goeddel, M.A. Palladino, and D.H. Smith. 1991. Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10535-10539.
346. Haak-Frendscho, M., S.A. Marsters, J. Mordenti, S. Brady, N.A. Gillett, S.A. Chen, and A. Ashkenazi. 1994. Inhibition of TNF by a TNF receptor immunoadhesin. Comparison to an anti-TNF monoclonal antibody. *J Immunol* 152:1347-1353.
347. Economides, A.N., L.R. Carpenter, J.S. Rudge, V. Wong, E.M. Koehler-Stec, C. Hartnett, E.A. Pyles, X. Xu, T.J. Daly, M.R. Young, J.P. Fandl, F. Lee, S. Carver, J. McNay, K. Bailey, S. Ramakanth, R. Hutabarat, T.T. Huang, C. Radziejewski, G.D. Yancopoulos, and N. Stahl. 2003. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* 9:47-52.
348. Wirtz, S., I. Tubbe, P.R. Galle, H.J. Schild, M. Birkenbach, R.S. Blumberg, and M.F. Neurath. 2006. Protection from lethal septic peritonitis by neutralizing the biological function of interleukin 27. *J Exp Med* 203:1875-1881.
349. Ancy, C., A. Kuster, S. Haan, A. Herrmann, P.C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 2003. A fusion protein of the gp130 and interleukin-6Ralpha ligand-binding domains acts as a potent interleukin-6 inhibitor. *J Biol Chem* 278:16968-16972. Epub 12003 Mar 16919.
350. Metz, S., G. Naeth, P.C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 2008. Novel inhibitors for murine and human leukemia inhibitory factor based on fused soluble receptors. *J Biol Chem*
351. Dreuw, A., S. Radtke, S. Pflanz, B.E. Lippok, P.C. Heinrich, and H.M. Hermanns. 2004. Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor GPL. *J Biol Chem*
352. Wahl, A.F., and P.M. Wallace. 2001. Oncostatin M in the anti-inflammatory response. *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3:iii75-80.
353. O'Hara, K.A., M.A. Kedda, P.J. Thompson, and D.A. Knight. 2003. Oncostatin M: an interleukin-6-like cytokine relevant to airway remodelling and the pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 33:1026-1032.
354. Faffe, D.S., L. Flynt, M. Mellema, P.E. Moore, E.S. Silverman, V. Subramaniam, M.R. Jones, J.P. Mizgerd, T. Whitehead, A. Imrich, R.A. Panettieri, Jr., and S.A. Shore. 2005. Oncostatin M causes eotaxin-1 release from airway smooth muscle: synergy with IL-4 and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 115:514-520.
355. O'Kane, C.M., P.T. Elkington, and J.S. Friedland. 2008. Monocyte-dependent oncostatin M and TNF-alpha synergize to stimulate unopposed matrix metalloproteinase-1/3 secretion from human lung fibroblasts in tuberculosis. *Eur J Immunol*
356. Langdon, C., C. Kerr, M. Hassen, T. Hara, A.L. Arsenault, and C.D. Richards. 2000. Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts in vitro and induces inflammation and destruction in mouse joints in vivo. *Am J Pathol* 157:1187-1196.
357. de Hooge, A.S., F.A. van de Loo, M.B. Bennink, D.S. de Jong, O.J. Arntz, E. Lubberts, C.D. Richards, and W.B. van den Berg. 2002. Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite

- synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Am J Pathol* 160:1733-1743.
358. Hui, W., A.D. Rowan, C.D. Richards, and T.E. Cawston. 2003. Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor alpha induces cartilage damage and matrix metalloproteinase expression in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 48:3404-3418.
359. Hui, W., T.E. Cawston, C.D. Richards, and A.D. Rowan. 2005. A model of inflammatory arthritis highlights a role for oncostatin M in pro-inflammatory cytokine-induced bone destruction via RANK/RANKL. *Arthritis Res Ther* 7:R57-64.
360. Plater-Zyberk, C., J. Buckton, S. Thompson, J. Spaul, E. Zanders, J. Papworth, and P.F. Life. 2001. Amelioration of arthritis in two murine models using antibodies to oncostatin M. *Arthritis Rheum* 44:2697-2702.
361. Yosipovitch, G., M.W. Greaves, and M. Schmelz. 2003. Itch. *Lancet* 361:690-694.
362. Greaves, M.W., and N. Khalifa. 2004. Itch: more than skin deep. *International archives of allergy and immunology* 135:166-172.
363. Bando, T., Y. Morikawa, T. Komori, and E. Senba. 2006. Complete overlap of interleukin-31 receptor A and oncostatin M receptor beta in the adult dorsal root ganglia with distinct developmental expression patterns. *Neuroscience* 142:1263-1271.
364. Goldenberg, M.M. 1999. Etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis. *Clinical therapeutics* 21:75-87; discussion 71-72.
365. Holash, J., S. Davis, N. Papadopoulos, S.D. Croll, L. Ho, M. Russell, P. Boland, R. Leidich, D. Hylton, E. Burova, E. Ioffe, T. Huang, C. Radziejewski, K. Bailey, J.P. Fandl, T. Daly, S.J. Wiegand, G.D. Yancopoulos, and J.S. Rudge. 2002. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11393-11398.
366. Kim, Y.S., W. Maslinski, X.X. Zheng, A.C. Stevens, X.C. Li, G.H. Tesch, V.R. Kelley, and T.B. Strom. 1998. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc gamma2a protein blocks delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 160:5742-5748.
367. Jazayeri, J.A., N. De Weerd, W. Raye, T. Velkov, L. Santos, D. Taylor, and G.J. Carroll. 2007. Generation of mutant leukaemia inhibitory factor (LIF)-IgG heavy chain fusion proteins as bivalent antagonists of LIF. *J Immunol Methods* 323:1-10.
368. Diveu, C., E. Venereau, J. Froger, E. Ravon, L. Grimaud, F. Rousseau, S. Chevalier, and H. Gascan. 2006. Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M/interleukin-31 shared receptor. *J Biol Chem* 281:36673-36682.
369. Ouyang, L., L.Y. Shen, T. Li, and J. Liu. 2006. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 27:197-202.
370. Wang, W.D., Z.T. Chen, D.Z. Li, Y.Z. Duan, Z.X. Wang, and Z.H. Cao. 2004. [Oncostatin M gene therapy in mice bearing lung adenocarcinoma xenograft using a hypoxia/radiation dual-sensitive promoter]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases* 27:240-243.
371. Halfter, H., C. Postert, M. Friedrich, E.B. Ringelstein, and F. Stogbauer. 2000. Activation of the Jak-Stat- and MAPK-pathways by oncostatin M is not sufficient to cause growth inhibition of human glioma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 80:198-206.
372. Halfter, H., F. Stogbauer, M. Friedrich, S. Serve, H. Serve, and E.B. Ringelstein. 2000. Oncostatin M-mediated growth inhibition of human glioblastoma cells does not depend on stat3 or on mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 75:973-981.

373. Kaplan, M.H. 2005. STAT4: a critical regulator of inflammation in vivo. *Immunologic research* 31:231-242.
374. Zhang, S.S., T. Welte, and X.Y. Fu. 2001. Dysfunction of Stat4 leads to accelerated incidence of chemical-induced thymic lymphomas in mice. *Experimental and molecular pathology* 70:231-238.
375. Hildner, K.M., P. Schirmacher, I. Atreya, M. Dittmayer, B. Bartsch, P.R. Galle, S. Wirtz, and M.F. Neurath. 2007. Targeting of the transcription factor STAT4 by antisense phosphorothioate oligonucleotides suppresses collagen-induced arthritis. *J Immunol* 178:3427-3436.

ANNEXES

Article 1***Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation.***

Boniface K., Diveu C., Morel F., Pedretti N., Froger J., Ravon E., Garcia M., Venereau E., Preisser L., Guignouard E., Guillet G., Dagregorio G., Pène J., Moles JP., Yssel H., Chevalier S., Bernard FX., Gascan H., Lecron JC.

J.Immunol. 2007 Apr 1;178(7):4615-22.

1. Effets pro-inflammatoires de l'OSM sur les kératinocytes

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression des récepteurs de l'OSM par les kératinocytes. Une analyse par PCR quantitative montre que ces cellules expriment le récepteur de type II de l'OSM (gp130 et OSMR) mais pas, ou très faiblement, le récepteur de type I (gp130 et LIFR) (Figure 1A). Ces résultats ont été confirmés par des expériences de cytométrie en flux et des western-blots (Figures 1B et C). Dans ces cellules, l'OSM induit la phosphorylation de STAT3 et des MAPK (Figure 1D, et G). A l'inverse, le LIF n'a aucun effet sur la phosphorylation de STAT3 (Figure 1F). L'utilisation d'anticorps neutralisants gp130 ou OSMR inhibe la phosphorylation de STAT3 en réponse à l'OSM (Figure 1E). Ces résultats démontrent donc l'expression du récepteur de type II par les kératinocytes ainsi que son implication dans la signalisation induite par l'OSM.

Nous avons ensuite étudié le profil transcriptionnel induit par l'OSM dans les kératinocytes et dans les épidermes reconstitués (Figure 2). L'OSM stimule fortement l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire et les défenses anti-microbiennes telles que S100A7, S100A8, S100A9, la β -défensine 2, le TGF- β et la CK6. Elle augmente également l'expression de gènes associés au chimiotactisme (IL-8, ENA-78 et MIP-2 α). A l'inverse, elle inhibe l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des kératinocytes (CK1, CK10, filaggrine, involucrine et lorocrine). Ces observations ont été confirmées par PCR quantitative, western-blots ou dosages ELISA (Figure 3). De plus, l'OSM augmente la production de VEGF (Figure 3E), suggérant un rôle dans l'angiogénèse.

Nous avons ensuite analysé la fonctionnalité de l'OSM dans un modèle de cicatrisation *in vitro* et dans des épidermes reconstitués. L'OSM stimule la migration des

kératinocytes, suggérant l'implication de cette cytokine dans la cicatrisation (Figure 4). Elle induit également un épaissement des épidermes reconstitués *in vitro*. Ces observations sont corrélées avec une diminution de l'expression des marqueurs de différenciation CK10 et filaggrine, et une augmentation de l'expression de S100A7 (Figure 5). Ces résultats confirment donc les observations précédentes.

2. Implication de l'OSM et de son récepteur de type II dans le psoriasis

Dans les kératinocytes, l'OSM augmente l'expression de protéines impliquées dans l'inflammation, le chimiotactisme et les défenses anti-microbiennes. A l'inverse, elle diminue l'expression de protéines associées à la différenciation des kératinocytes. De plus, elle induit un phénotype cutané inflammatoire ressemblant aux lésions psoriasiques. Nous avons alors comparé l'expression de l'OSM et de ses récepteurs dans des peaux saines et dans des lésions cutanées psoriasiques. Comme le montre la figure 6A, ces lésions sont caractérisées par un épaissement de l'épiderme et une surexpression de S100A7. Des études d'immunohistochimie montrent une plus forte expression de l'OSMR dans les lésions de patients atteints de psoriasis (ou de dermatite atopique) comparés à des sujets sains. En ce qui concerne l'OSM, elle est détectée dans les lésions psoriasiques mais pas dans les peaux saines (Figure 6B). Les lymphocytes T représentent une source importante d'OSM. Nous avons donc étudié la capacité des lymphocytes T, infiltrant les lésions psoriasiques, à produire cette cytokine. Après une expansion *in vitro* et une activation par des anti-CD3, anti-CD-28 et de l'IL-2, nous avons dosé la production d'OSM par ELISA. Les lymphocytes T infiltrant les lésions produisent des quantités plus importantes d'OSM que les lymphocytes T périphériques issus des mêmes patients ou de sujets sains.

Afin de replacer l'OSM dans le réseau de cytokines impliquées dans la physiopathologie du système cutané, nous avons testé l'activité de 33 cytokines sur les kératinocytes (Figure 7). Nous avons ainsi montré que l'OSM est l'une des cytokines les plus actives avec l'IL-17 et le TNF- α et que ces trois cytokines agissent en synergie.

Cette étude suggère donc que l'OSM joue un rôle important dans l'initiation et/ou le maintien de la réponse cutanée inflammatoire mais également dans les processus de cicatrisation.

Oncostatin M Secreted by Skin Infiltrating T Lymphocytes Is a Potent Keratinocyte Activator Involved in Skin Inflammation¹

Katia Boniface,^{2*} Caroline Diveu,^{2†**} Franck Morel,^{*} Nathalie Pedretti,[‡] Josy Froger,^{†**} Elisa Ravon,^{†**} Martine Garcia,^{*} Emilie Venereau,^{†**} Laurence Preisser,^{†**} Emmanuel Guignouard,^{*} Gérard Guillet,^{*§} Guy D'Agostino,^{*||} Jérôme Pène,^{||} Jean-Pierre Moles,[#] Hans Yssel,^{||} Sylvie Chevalier,^{†**} François-Xavier Bernard,[‡] Hugues Gascan,^{3†**} and Jean-Claude Lecron^{3*}

Cutaneous inflammatory diseases such as psoriasis vulgaris and atopic dermatitis are associated with altered keratinocyte function, as well as with a particular cytokine production profile of skin-infiltrating T lymphocytes. In this study we show that normal human epidermal keratinocytes express a functional type II oncostatin-M (OSM) receptor (OSMR) consisting of the gp130 and OSMR β components, but not the type I OSMR. The type II OSMR is expressed in skin lesions from both psoriatic patients and those with atopic dermatitis. Its ligand, OSM, induces via the recruitment of the STAT3 and MAP kinase pathways a gene expression profile in primary keratinocytes and in a reconstituted epidermis that is characteristic of proinflammatory and innate immune responses. Moreover, OSM is a potent stimulator of keratinocyte migration in vitro and increases the thickness of a reconstituted epidermis. OSM transcripts are enhanced in both psoriatic and atopic dermatitic skin as compared with healthy skin and mirror the enhanced production of OSM by T cells isolated from diseased lesions. Results from a microarray analysis comparing the gene-modulating effects of OSM with those of 33 different cytokines indicate that OSM is a potent keratinocyte activator similar to TNF- α , IL-1, IL-17, and IL-22 and that it acts in synergy with the latter cytokines in the induction of S100A7 and β -defensin 2 expression, characteristic of psoriatic skin. Taken together, these results demonstrate that OSM and its receptor play an important role in cutaneous inflammatory responses in general and that the specific effects of OSM are associated with distinct inflammatory diseases depending on the cytokine environment. *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 4615–4622.

The skin is a large and complex tissue providing a protective interface between the organism and its environment. The epidermis forms the regenerating outer surface of the skin and consists of multiple layers of specialized epithelial cells, the keratinocytes. In response to stress or injury, keratinocytes release signaling molecules that modulate the expression of cell surface receptors and modify their cytoskeleton morphology, thereby altering their proliferative and migratory capacities. These changes

are closely associated with an inflammatory response that leads to either wound healing or defense against microbial infection, and often leading to chronic disease. Among the most common inflammatory skin diseases in the Western population are psoriasis vulgaris and atopic dermatitis. Although the mechanisms underlying their pathogenesis are different, both disorders are associated with keratinocyte hyperplasia, proliferation, and altered differentiation as well as with the presence of increased numbers of T cells in the lesions secreting a wide variety of cytokines. It is generally accepted that immune responses in atopic dermatitis are associated with the activity of cytokines secreted by Th2 lymphocytes that contribute to the high IgE levels and eosinophilia characteristic of this condition. In contrast, the immune response in psoriasis is mediated by Th1 and most likely by Th17 cells (1) that secrete inflammatory cytokines and are furthermore associated with local neutrophil infiltration. Interestingly although both skin diseases are characterized by defective skin barriers, patients with atopic dermatitis, in contrast to those with psoriasis, suffer from frequent serious skin infections (2) that are associated with a particular gene expression profile in epidermal keratinocytes (3).

Oncostatin M (OSM)⁴ is a member of the IL-6 family of cytokines, which are multifunctional proteins involved in immunity, hemopoiesis, bone modeling, and inflammatory processes. Mainly secreted by activated T cells, monocytes, and dendritic cells, OSM

*UPRES-EA 3806, Centre Hospitalier de l'Université de Poitiers, Poitiers, France; †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte 564, Angers, France; ‡BIOalternatives, Gençay, France; §Service de Dermatologie, Centre Hospitalier de l'Université La Milétrie, Poitiers, France; ||Service de Chirurgie Plastique, Centre Hospitalier de l'Université La Milétrie, Poitiers, France; ||Unité Mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 454, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France; and #Laboratoire de Dermatologie Moléculaire, Institut Universitaire de Recherche Clinique, Montpellier, France; **Université d'Angers, Angers, France

Received for publication April 3, 2006. Accepted for publication January 16, 2007.

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

¹ This study was supported by Grant 5176 from the Association pour la Recherche contre le Cancer, by the Post-genome Program of the Région Pays de la Loire and by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique and R&D program of the CHU de Poitiers. C.D., E.V., and K.B. were supported by Grants from the Angers Agglomération, the Société Française d'Hématologie, Ministère de la Recherche, and the Région Poitou-Charentes, respectively.

² K.B. and C.D. contributed equally to this work.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Jean-Claude Lecron, University of Poitiers, LabCytokines, Pole Biologie Sante, 40 Avenue du Recteur Pineau, Poitiers, France. E-mail address: jean-claude.lecron@univ-poitiers.fr or Dr. Hugues Gascan, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte 564, 4 Rue Larrey, F-49933 Angers, France. E-mail address: gascan@univ-angers.fr

⁴ Abbreviations used in this paper: OSM, oncostatin M; OSMR, OSM receptor; LIF, leukemia inhibitory factor; LIFR, LIF receptor; NHEK, normal human epidermal keratinocyte; RHE, reconstituted human epidermis; CK, cytokeratin; VEGF, vascular endothelial growth factor.

is a proinflammatory mediator that strongly triggers acute phase protein synthesis by liver cells (4, 5). Many of its biological functions are also shared with the leukemia inhibitory factor (LIF), another IL-6 family member. These shared and specific functions of OSM are explained by the existence of two types of OSM receptor (OSMR) complexes. In addition to the common LIF/OSMR type I receptor complex composed of the gp130 and LIF receptor β (LIFR β) subunits, OSM also specifically recognizes a type II receptor in which the gp130 receptor chain is associated with the OSMR β -chain (6–8). The OSM-induced signaling cascade involves activation of certain Janus kinases (JAK1, JAK2, and Tyk2) and signal transducers and activators of transcription (STAT1 and STAT3), as well as MAPK pathways (9). The OSMR β subunit is mainly expressed by fibroblasts, endothelial, hepatic, lung, and hemopoietic cells, and it has been reported that OSMR β can be also recruited by IL-31, a recently identified cytokine with skin tropism (10).

In the present study we have determined the expression of both OSMR and OSM in the lesions of cutaneous inflammatory diseases and have investigated the effect of OSM on keratinocytes in vitro and in vivo by analyzing a gene expression profile specifically selected to study keratinocyte structure and function (11). We show that the expression of the type II, but not the type I OSMR, is enhanced in both psoriatic and atopic dermatitis lesions and that OSM-induced, STAT3-mediated keratinocyte alteration is associated with cutaneous inflammatory responses.

Materials and Methods

Cell culture

All of our studies involving human tissues were reviewed and approved by the institutional ethics committee on human experimentation "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale" of the Région Poitou-Charentes. Normal human epidermal keratinocytes (NHEK) were obtained and cultured as described previously (12). A keratinocyte migration assay was performed as described previously (13). In vitro reconstituted human epidermis (RHE) was purchased from SkinEthic Laboratories (14). Skin-infiltrating or peripheral blood T cells were expanded using Expander beads (Invitrogen Life Technologies) as described previously (15, 16). For cytokine production, 2×10^6 T cells/ml were activated with immobilized anti-CD3 mAb, anti-CD28 mAb, and IL-2 for 24 h and cytokine production was analyzed by ELISA.

Reagents

Cytokines were purchased from R&D Systems Anti-gp130 (AN-HH1, AN-HH2, AN-G30), anti-OSMR β (AN-N2, AN-R2, and AN-V2), and anti-LIFR β (AN-E1) mAbs were produced in the laboratory, and the neutralizing anti-OSMR β Ab (XR-M70) came from Immunex. Polyclonal anti-gp130, anti-LIFR β , anti-STAT3, anti-S100A8, and anti-S100A9 Abs were from Santa Cruz Biotechnology; anti-S100A7 and anti- β -tubulin Abs were from Imgenex and Sigma-Aldrich, respectively; anti-phospho-STAT3, phospho-MAPK, and MAPK were from Upstate Biotechnology; goat anti-mouse and anti-rabbit peroxidase-labeled Ig were from ClineSciences; rabbit anti-goat peroxidase-conjugated Ab was from Sigma-Aldrich; and the anti-cytokeratin (CK) 10 and anti-filaggrin Abs were from Lab Vision. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and TNF- α were quantified using the BD cytometric bead array (BD Biosciences). The detection of OSM, CXCL5, MIP-3 β , CCL17, and vascular endothelial growth factor (VEGF) was conducted using ELISA kits bought from R&D Systems.

Flow cytometric and immunohistochemical analyses

For flow cytometric analyses, cells were incubated with the appropriate primary mAb (AN-G30, AN-N2, or AN-E1) or with an isotype control mAb followed by incubation with a PE-conjugated anti-mouse mAb and analyzed using a BD Biosciences flow cytometer. For immunohistochemical analysis, 10- μ m cryostat sections were fixed, permeabilized, and immunostained with the relevant primary Ab (AN-R2) and the avidin peroxidase method (Vector Laboratories). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich) before mounting.

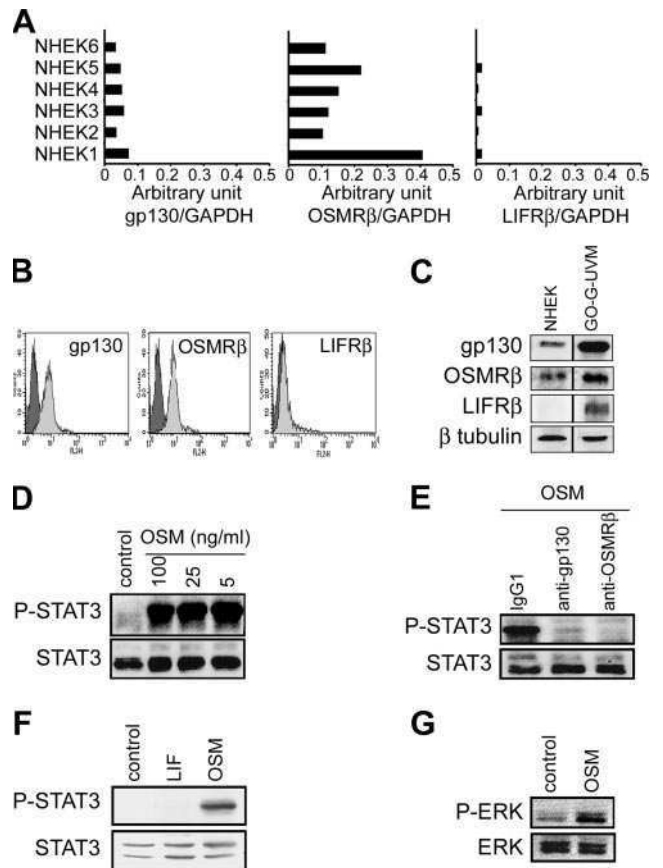


FIGURE 1. Type II OSM receptor expression and OSM-induced signaling pathways in NHEK. **A**, Quantitative RT-PCR analysis was conducted on total RNA from six independent NHEK cultures. gp130, OSMR β , and LIFR β mRNA expression levels are shown relative to the housekeeping GAPDH mRNA. **B**, Flow cytometric analysis of gp130, OSMR β , and LIFR β expression on NHEK. The dark gray histograms correspond to the isotype control Ab binding and the light gray histograms to the detection of gp130, OSMR β , or LIFR β , respectively. **C**, Western blot was performed on immunoprecipitated NHEK lysate using anti-gp130, anti-OSMR β , or anti-LIFR β Abs. The GO-G-UVM glioblastoma cell line was used as a positive control. **D**, NHEK were stimulated for 15 min in the presence or absence of the indicated concentrations of OSM. Phospho-STAT3 (P-STAT3) and STAT3 protein levels were determined by Western blotting. **E**, Cells were incubated for 2 h in the presence of 15 μ g/ml neutralizing anti-gp130 and anti-OSMR β mAbs or an isotype control Ab before a 15-min stimulation with 50 ng/ml OSM. P-STAT3 and STAT3 were immunodetected as in **D**. **F**, NHEK were stimulated for 15 min with or without 50 ng/ml OSM or LIF. P-STAT3 and STAT3 were immunodetected as in **D**. **G**, Phospho-ERK (P-ERK) and ERK protein levels were analyzed by Western blotting in response to a 50 ng/ml OSM stimulation.

Gene expression profiling using cDNA arrays

Poly(A)⁺ RNA enrichment and hybridization to custom Atlas array membranes displaying 600 cDNAs (11) were performed according to the manufacturer's recommendations (Clontech Laboratories) as previously described (12).

A study of the effects of 33 cytokines on the overall expression of 154 genes of potential interest for skin physiology was performed using keratinocyte designed cDNA microarrays (17).

Quantitative RT-PCR analysis

cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using random hexamer primers. Quantitative RT-PCR was conducted using the LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kit (Roche) and the following primers: gp130 (forward 5'-CCGCCACATAATTTATCAGT-3' and reverse 5'-AAGGCTTGGACAGTGAATG-3'); OSMR β (forward

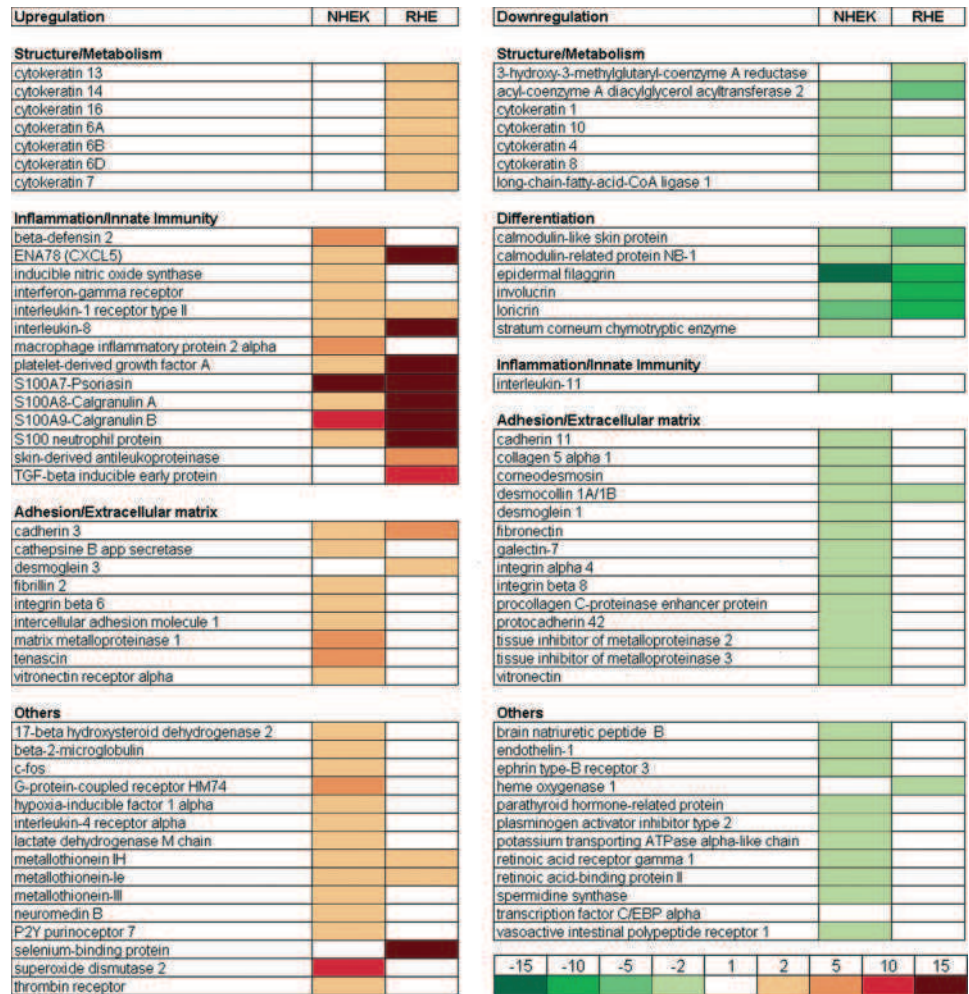


FIGURE 2. Gene expression profiles obtained from OSM-stimulated NHEK and RHE NHEK or RHE were cultured in the presence or absence of 10 ng/ml OSM for 24 h. Total RNA was isolated and used to make ³³P-labeled cDNA probes, which were hybridized to skin designed array membranes displaying 600 cDNAs. The OSM-induced modulation was expressed as the ratio of the signal intensities for cells treated with OSM over unstimulated cells.

5'-AGATTGAACTCCATGGTGAA-3' and reverse 5'-GCTTCAAGTGTGGTGAAGTT-3'); LIFRβ (forward 5'-TCTTGCGAGCCTATACAGAT-3' and reverse 5'-TCTGGATTTGGAATATCAGG-3'); S100A7, S100A8 and S100A9 (12), β-defensin 2 (forward 5'-GCCATCAGCCATGAGGGTCTTG-3' and reverse 5'-AATCCGCATCAGCCACAGCAG-3'); filaggrin (forward 5'-AGAACAGGCAAGGTCAAGTCCAG-3' and reverse 5'-CACGTGTGAACTCTTGGTGGCTCT-3'); OSM (forward 5'-TCAGTCTGGTCTTGCCTC-3' and reverse 5'-CTGCAGTGTCTCTCAGTTT-3'); and GAPDH (forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' and reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3') and hydroxymethylbilane synthase (12) as housekeeping genes.

Western blotting analysis

For STAT3 and MAPK phosphorylation and β-tubulin expression, NHEK were lysed in SDS sample buffer, submitted to SDS-PAGE, transferred onto an Immobilon membrane, and stained with the appropriate Ab. The reaction was visualized by chemiluminescence. To determine the expression of the gp130, OSMRβ, and LIFRβ chains, cells were lysed in Brij 96 lysis buffer as described previously (18). Samples were subsequently incubated overnight with the indicated mAbs (AN-G30, AN-V2, or AN-E1), and the complexes were isolated using protein A beads before being treated as described above. Analysis of S100A7, S100A8, and S100A9 protein expression was conducted as previously described (12) on NHEK cultured in the absence or presence of OSM.

Results

Human keratinocytes express a functional type II OSMR on their surface

We first studied the expression profile of the type I and type II OSMR by NHEK by analyzing the expression levels of transcripts for the gp130, LIFRβ, and OSMRβ chains. NHEK, established

from six different healthy donors, predominantly expressed transcripts for OSMRβ and gp130, whereas only very faint levels of LIFRβ mRNA were detected (Fig. 1A). In agreement with these results, NHEK were found to express both the gp130 and OSMRβ chains, but no LIFRβ subunit, at their cell surfaces as shown by flow cytometric and Western blotting analyses (Fig. 1, B and C).

Engagement of a functional OSMR results in activation of STAT3, and therefore we analyzed the capacity of OSM to induce the activation of this signaling pathway in NHEK. As shown in Fig. 1D, stimulation of NHEK with OSM strongly induced tyrosine phosphorylation of STAT3. The addition of either a neutralizing anti-gp130 or an anti-OSMRβ mAb to the cultures before OSM stimulation resulted in decreased STAT3 phosphorylation (Fig. 1E), indicating that both of the subunits defining the type II OSMR are involved in OSM-mediated STAT3 activation in keratinocytes. In contrast, stimulation of NHEK with LIF, at concentrations ranging from 3 to 100 ng/ml, did not result in STAT3 activation (Fig. 1F and data not shown).

Because signaling via the type II OSMR complex is also known to recruit the MAPK pathway (19), we measured ERK1/2 tyrosine phosphorylation levels in NHEK. Stimulation of NHEK with OSM led to a rapid increase in ERK1/2 phosphorylation levels (Fig. 1G). Taken together, these results demonstrate that human keratinocytes express a functional type II OSMR complex, but no type I OSMR complex, on their cell surface.

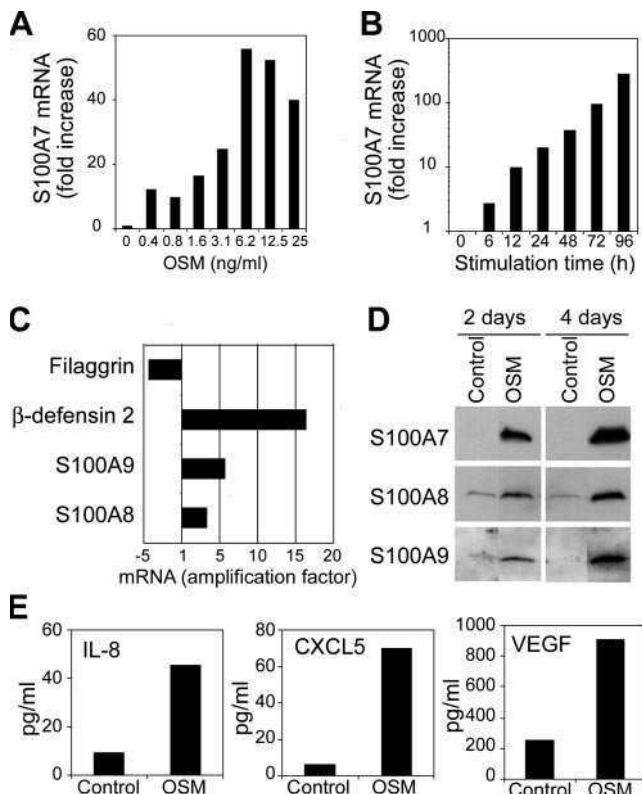


FIGURE 3. Biological effects of OSM on keratinocytes. *A*, NHEK were cultured with the indicated OSM concentrations for 48 h and a quantitative RT-PCR analysis of S100A7 mRNA expression was performed. Results are expressed as the relative expression of stimulated cells over control cells. *B*, NHEK were cultured for the indicated time in the presence of 10 ng/ml OSM and a quantitative RT-PCR analysis of S100A7 mRNA expression was performed. *C*, NHEK were cultured with or without 10 ng/ml OSM for 48 h and a quantitative RT-PCR analysis of S100A8, S100A9, β -defensin 2, and filaggrin mRNA expression was performed. *D*, NHEK were cultured with or without 10 ng/ml OSM for 48 and 96 h. S100A7, S100A8, and S100A9 protein levels were determined by Western blotting. *E*, IL-8, CXCL5, and VEGF concentrations were determined by ELISA or cytometric bead array analysis in RHE culture supernatants after a 48-h stimulation with or without 10 ng/ml OSM.

OSM modulates the expression of genes associated with human keratinocyte function

We next analyzed the keratinocyte gene expression profile and its regulation by OSM using macroarrays composed of cDNAs that were specifically designed to study keratinocyte structure and function (11). The results depicted in Fig. 2 are based on the analysis of transcripts expressed by NHEK, as well as by RHE following a 24-h stimulation with OSM. In both models OSM up-regulated the expression of 34 and 22 genes, respectively, encoding proteins involved in structure/metabolism, inflammation/innate immunity, or tissue remodeling. A major induction of transcripts was observed for genes encoding antimicrobial proteins such as S100A7-psoriasin and β -defensin 2, as well as S100A8-calgranulin A, S100A9-calgranulin B, S100 neutrophil protein, platelet-derived growth factor A, TGF- β , and CK6 (Fig. 2), which are produced in inflammatory situations. OSM also induced the transcription of genes associated with chemotaxis such as CXCL5, IL-8, and MIP-2 α , as well as matrix metalloproteinase 1 and tenascin, involved in tissue remodeling. In addition, OSM specifically down-regulated a large set of genes encoding proteins associated with adhesion, the extracellular matrix, and keratinocyte

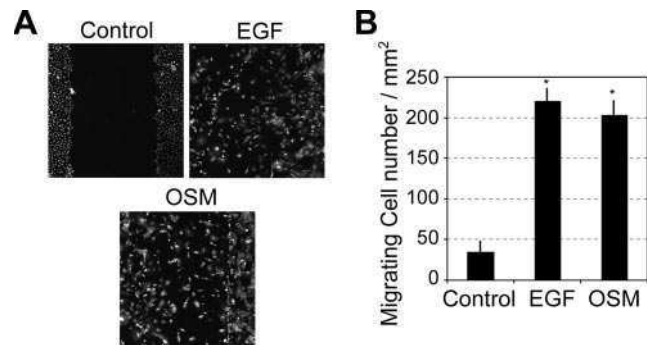


FIGURE 4. OSM induces keratinocyte migration in vitro. In vitro wounds were conducted in mitomycin-treated confluent NHEK culture and the keratinocytes were further cultured for 48 h with or without 10 ng/ml epidermal growth factor or OSM. *A*, Cell migration to the cell-free area was assessed as described in *Materials and Methods*. *B*, Each bar represents the mean \pm SEM of migrating keratinocytes counted in four non-overlapping fields. *, $p < 0.001$ compared with respective control without cytokine; based on an unpaired Student *t* test.

differentiation such as CK1, CK10, calmodulin-like skin protein, calmodulin-related protein NB1, filaggrin, involucrin, and loricrin.

The expression of selected genes involved in keratinocyte activation (S100A7, S100A8, S100A9, and β -defensin 2) or differentiation (filaggrin) was further studied by quantitative RT-PCR and Western blotting analyses. The results corroborated those from the analysis conducted using macroarrays (Fig. 3, A–D).

The induction of growth factors and cytokine production in response to OSM was further studied by immunodetection in culture supernatants from NHEK or RHE. OSM increased the production of IL-8 and CXCL5, both chemokines with strong neutrophil chemoattractant activity (Fig. 3E), whereas the production of chemokines with different cell tropism (MIP-3 β and CCL17) was not affected (data not shown). The production levels of several major proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, and TNF- α) was not modified by the addition of OSM (data not shown), suggesting that OSM stimulation may lead to a restricted inflammatory response in the epidermis. Finally, the production of VEGF, a major mediator of angiogenesis, was also induced in response to OSM (Fig. 3E), suggesting that OSM may contribute to the neovascularization of tissues in the inflammatory skin disease process. Taken together, these results indicate that, in keratinocytes, OSM is able to activate the transcription of a number of genes involved in innate immune responses, inflammation, tissue remodeling, and angiogenesis.

OSM is a potent inducer of keratinocyte migration and triggers hyperplasia of the reconstituted human epidermis

Keratinocytes play an important role in both the pathogenesis of cutaneous inflammatory diseases and the wound-healing process. We therefore analyzed the functional effects of OSM on human keratinocytes by using an in vitro wound-healing model, based on the induction of keratinocyte migration, in which proliferation is inhibited. As shown in Fig. 4, OSM strongly enhanced the motility of NHEK to a similar extent as that induced by epidermal growth factor, which is known to promote the migration of keratinocytes and was used as a positive control (13).

To extend these observations to a more dynamic model of epidermal differentiation, we investigated the effects of OSM on basal cell layer proliferation and keratinocyte differentiation using a reconstituted human epidermis. RHE grown in the absence of OSM presented a keratinized, multistratified epithelium containing intact

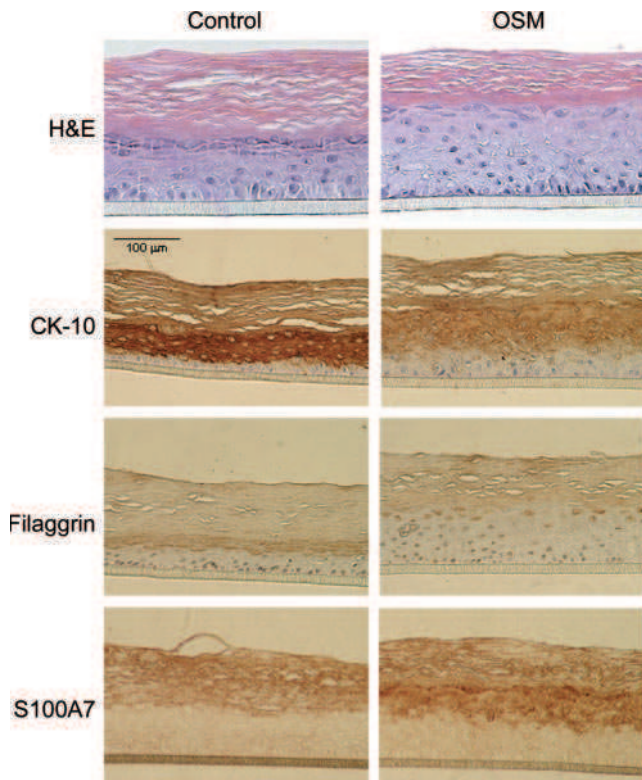


FIGURE 5. OSM induces the hyperplasia of keratinocytes layers in RHE *in vitro*. Histological and immunohistochemical analysis of RHE either unstimulated or stimulated with 10 ng/ml OSM for 4 days. RHE were fixed and embedded in paraffin and 4- μ m vertical sections were stained with H&E or with anti-CK10, anti-filaggrin, or anti-S100A7 mAbs.

basal, spinous, granulous, and cornified cell layers and numerous keratohyalin granules in the upper granular layer (Fig. 5). The addition of OSM to RHE triggered hyperplasia of the spinous keratinocyte layer, leading to an increase in the overall thickness of the reconstituted tissue. This effect was accompanied by a decrease of keratohyalin granules in the granular layer as well as by the presence of pyknotic nuclei. OSM-treated RHE were further characterized by an enhanced expression of S100A7, as well as a down-modulation of filaggrin and CK10 expression (Fig. 5), in agreement with the gene expression profile induced by OSM (Fig. 2).

Both type II OSMR expression and OSM production are enhanced in inflammatory skin diseases

Because OSM was found to be a potent inducer of keratinocyte motility and to trigger hyperplasia of RHE, suggesting its potential role in the pathogenesis of inflammatory skin disorders, we determined the expression of the OSMR β -chain in psoriatic and atopic dermatitic lesions by immunohistochemical analysis. Lesions of both pathologies were characterized by a thickened epidermis, a decreased stratum granulosum, parakeratosis, and a strong up-regulation of S100A7 expression. In addition to the ubiquitous expression of gp130 (data not shown), the OSMR β -chain was highly expressed in lesions from both psoriatic and atopic dermatitic skin, as compared with healthy tissue (Fig. 6A).

Moreover, both psoriatic and atopic dermatitic lesions contained elevated levels of OSM mRNA, in contrast to biopsies taken from healthy skin where the expression of these transcripts was undetectable (Fig. 6B). To determine whether T cells infiltrating cutaneous inflammatory sites are a source of OSM, T cells were isolated from skin biopsies, expanded for 10–12 days in culture, and

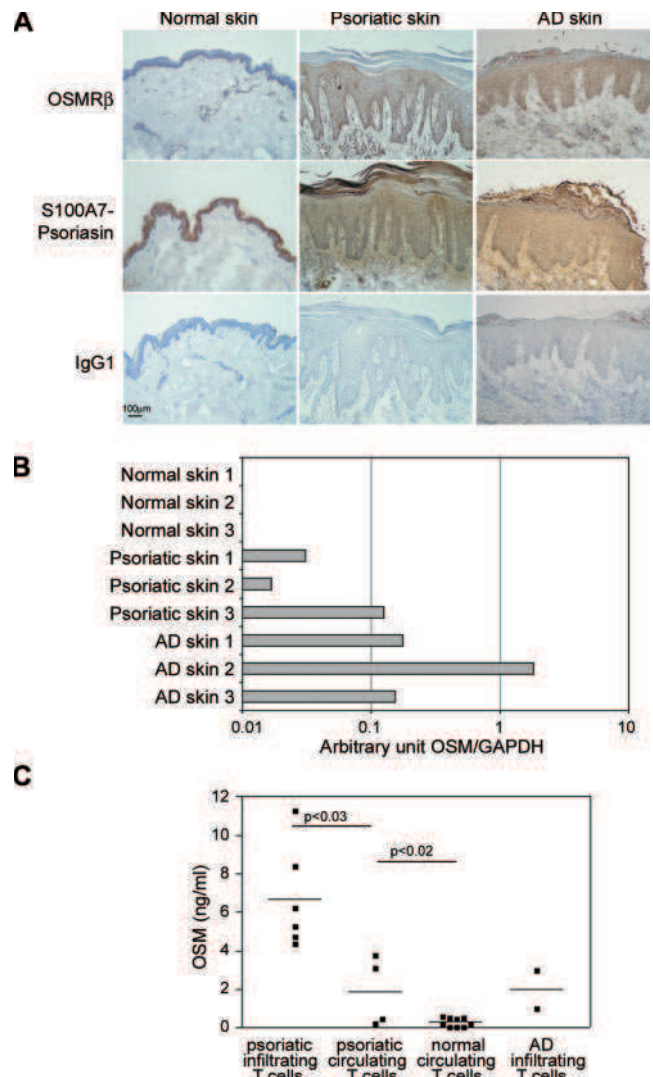


FIGURE 6. Expression of OSM and type II OSMR in skin inflammatory diseases. *A*, Ten-micrometer cryostat sections of skin biopsy from healthy donors and psoriatic or atopic dermatitic (AD) patients were fixed and subjected to immunohistochemistry for OSMR β and S100A7. One experiment representative of four is shown. *B*, OSM transcripts were PCR quantified from total RNA extracted from healthy skin and psoriatic or atopic dermatitic lesional skin (AD skin). *C*, Lesion-infiltrating T cells or peripheral blood-circulating T cells were expanded *in vitro* by one stimulation using anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and IL-2. After a 12-day culture period, cells were stimulated again for 24 h before harvesting the culture supernatants for OSM determination. The *p* values were calculated using the unpaired Student *t* test. AD, atopic dermatitis.

subsequently analyzed for their capacity to produce OSM. T cells isolated from the cutaneous lesions of patients with psoriasis or atopic dermatitis or derived from the peripheral blood of psoriatic patients produced higher levels of OSM following activation than peripheral blood-derived T cells from healthy individuals (Fig. 6C). Taken together, our results demonstrate that T cells infiltrating inflammatory skin lesions are important sources of OSM and therefore may contribute, via the induction of keratinocyte inflammation, to skin pathology.

OSM is one of the major cytokines involved in keratinocyte activation and differentiation

Skin inflammation results from the action of a cytokine network in which OSM is only a single player among many. To more precisely define the contribution of OSM to this process, its capacity

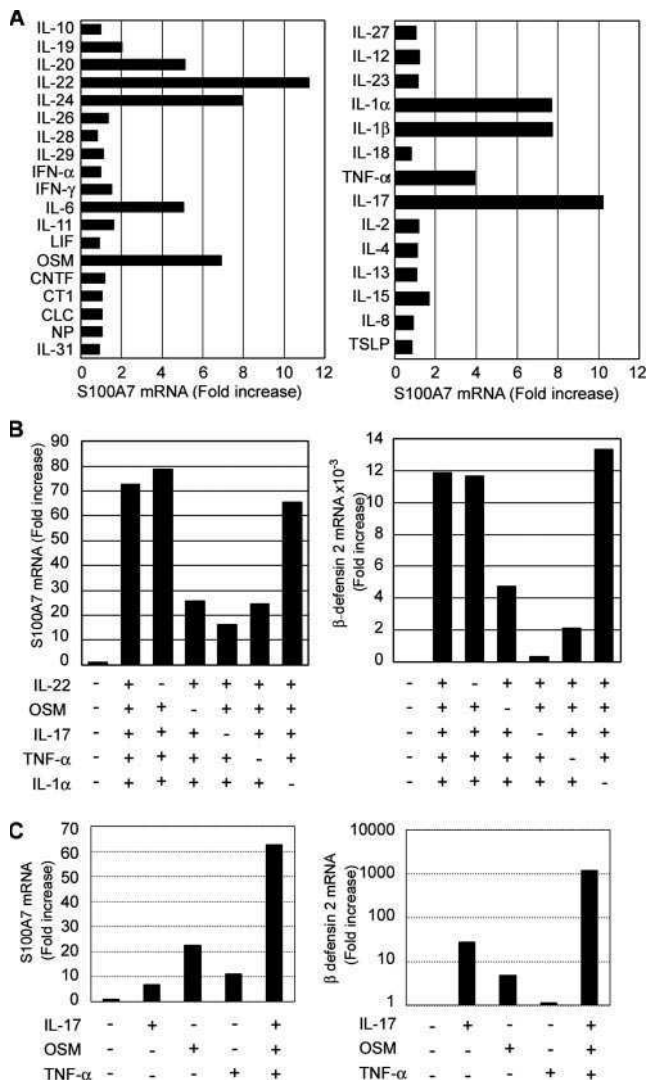


FIGURE 7. TNF- α , IL-17 and OSM are major modulators of S100A7 and β -defensin 2 mRNA expression. **A**, NHEK were cultured in the presence or absence of the indicated cytokines (10 ng/ml) for 24 h. Relative S100A7 mRNA expression was determined by quantitative RT-PCR analysis. CNTF, Ciliary neurotrophic factor; CT, cardiotrophin 1; CLC, cardiotrophin-like cytokine; NP, neuropoietin; and TSLP, thymic stromal lymphopoietin. **B**, NHEK were stimulated for 24 h in the presence or absence of the indicated combination of TNF- α , IL-17, IL-22, IL-1 α , or OSM (1 ng/ml). Relative S100A7 and β -defensin 2 mRNA expression was determined by quantitative RT-PCR analysis. Results are expressed as the relative expression of stimulated cells as compared with control cells. **C**, RHE were stimulated for 24 h in the presence or absence of 10 ng/ml TNF- α , IL-17, and/or OSM. Relative S100A7 and β -defensin 2 mRNA expression was determined by quantitative RT-PCR analysis. Results are expressed as the relative expression of stimulated cells as compared with control cells.

to modulate the expression of keratinocyte inflammatory, innate immunity, and differentiation gene profile was compared with that of a comprehensive series of 33 cytokines, using microarray analysis.

The results from this extensive analysis showed that only few cytokines, i.e., IL-1 α and β , IL-6, IL-17, IL-20, IL-22, IL-24, and TNF- α , were able to induce a gene expression profile in NHEK comparable to that induced by OSM (data not shown). This finding was further sustained by quantitative RT-PCR analysis of S100A7 gene expression, showing that induction of this gene was restricted to the above-mentioned cytokines (Fig. 7A).

We next analyzed in detail the contribution of the most potent cytokine from each cytokine subfamily to the induction of S100A7 and β -defensin 2 gene expression by quantitative RT-PCR. The combined effects of IL-1 α , IL-17, IL-22, TNF- α , and OSM at a suboptimal concentration of 1 ng/ml led to a strong synergistic induction of the expression of analyzed genes (Fig. 7B). Furthermore, by successive elimination, IL-17, TNF- α , and OSM were identified as the major response-inducing cytokines (Fig. 7B). Finally, by using in vitro RHE we confirmed that, similarly, the combination of IL-17, TNF- α , and OSM led to a strong synergistic induction of S100A7 and β -defensin 2 mRNA expression when compared with the action of each cytokine alone (Fig. 7C).

Discussion

Psoriasis and atopic dermatitis are the most frequent cutaneous inflammatory disorders affecting the population in Western countries. Although they differ in their origin, it is generally accepted that the pathogenesis of each of these diseases is associated with immune responses implicating the activity of T cells that reside in cutaneous inflammatory sites (20). In particular, the production by these cells of various set of cytokines is involved in the activation, proliferation, and hyperplasia of keratinocytes that are characteristics of the chronic cutaneous inflammation observed in these disorders.

In the present study, we show that OSM secreted by skin-infiltrating T cells is capable of modulating the expression of a large number of genes involved in keratinocyte function. These OSM-induced effects are mediated specifically via the type II OSMR, composed of the gp130 and OSMR β chains, which is, in contrast to the type I OSMR, functionally expressed on keratinocytes from healthy skin, thereby extending a recent report in the literature (21). Moreover, the expression of the OSMR-chain transcripts is strongly enhanced both in cutaneous lesions from patients with psoriasis or atopic dermatitis as compared with that in normal skin, suggesting an up-regulation of type II OSMR expression under conditions of cutaneous inflammation.

As shown in the present and previous studies, the interaction of the type II OSMR with its ligand results in the activation of STAT3 (22). The critical role of the STAT3 signaling pathway in the regulation of pathologic skin immune responses and, in particular, the pathogenesis of psoriasis has been well documented. Keratinocyte-specific ablation of STAT3 in a conditional transgenic mouse model was shown to lead to impaired skin remodeling because of a decrease in the growth factor-induced migration of keratinocytes (13). Moreover, transgenic mice expressing a constitutively active form of STAT3 in keratinocytes develop skin lesions resembling those of human psoriasis (23). It is of note that the induction of this particular phenotype in these transgenic mice not only requires activated STAT3 in keratinocytes but also their interaction with activated T cells, underscoring the importance of T cell-mediated immunity. Our observation that OSM-mediated signaling in human keratinocytes involves the activation of the STAT3 pathway and that the expression of both type II OSMR and OSM are increased in psoriatic lesions suggest that this cytokine might play a role in certain aspects of the pathogenesis of this disease in humans. During the reviewing process of the present work, a related study describing the importance of OSM in the induction of psoriasis-associated genes was published (24). Both studies underline a putative role for OSM in psoriasis. In contrast, the enhanced expression of type II OSMR and OSM in the lesional skin of patients with atopic dermatitis and the production of OSM by T cells isolated from these lesions indicate that OSM is likely to have a broader function in skin inflammation.

Indeed, among the predominant gene products induced by OSM in the cultures of primary keratinocytes and in the reconstituted epidermis are S100A7, also known as psoriasin, and S100A8 and S100A9, which belong to a family of small calcium-binding proteins with inflammation-inducing properties (25). The relevance of the induction of members of the S100 family of proteins by OSM in cutaneous inflammation is furthermore corroborated by the observation that S100A7, S100A8, and S100A9 are detected only at very low levels in the epidermis of healthy donors, whereas their expression is strongly induced in keratinocytes from psoriatic and atopic dermatitic lesions (26, 27).

Both S100A8 and S100A9 have chemotaxis-inducing activity and are strong chemoattractants for neutrophils (28). Moreover, OSM induces the production of IL-8 and CXCL5 by keratinocytes, known to mediate the chemoattraction of the latter cells via CXCR2 (29–31). Because cellular infiltrates in psoriatic contain large numbers of neutrophils (32) that are present in the so-called Munro's microabscess, these results indicate that OSM, via its effect on keratinocytes, might be involved in leukocyte chemotaxis to these inflammatory skin lesions, thereby contributing to the local cutaneous inflammation.

Keratinocytes from psoriatic patients also produce high levels of antimicrobial peptides (3, 33). These peptides, present only at negligible levels in normal skin, are essential in the cutaneous innate immune response to invading microorganisms, as shown in animal models of infection (34). They might be, at least partially and independently of the bacteriocidal activity of neutrophils, responsible for the lesser susceptibility of psoriatic patients to infections with microorganisms, as compared to patients with atopic dermatitis who frequently suffer from serious skin infections. In particular, S100A7 has been shown to confer resistance to infection of the skin by *Escherichia coli* (35). Similarly, β -defensin 2, another protein with anti-microbial activities (36) induced by OSM in human keratinocytes, is expressed at high levels in psoriatic lesions (37). The lower antimicrobial peptide production observed in atopic dermatitic skin, despite the increased expression of the type II OSMR and its ligand, could be a result of the concomitant increased production of IL-4, IL-10 and IL-13 in these patients, which have previously been described as inhibitors of β -defensin 2 synthesis (3, 38).

As reported previously, transcripts for several STAT3-signaling cytokines, including IFN- γ , IL-6, and the IL-10 related-cytokines IL-19, IL-20, and IL-22, are increased in psoriatic lesions (17, 39, 40). In addition, a number of cytokines that do not activate STAT3 following interaction with their respective receptors, such as IL-1, IL-17, and TNF- α , are also overexpressed in psoriasis (39, 41, 42), suggesting their implication in this disease. By comparing the capacity of a large series of cytokines to modulate the expression of genes associated with keratinocyte-mediated inflammation, chemotaxis, and innate immune responses, we found that among the STAT3-signaling cytokines OSM is one of the most potent mediators of keratinocyte activation. Moreover, by using combinations of IL-1 α , IL-17, IL-22, TNF- α , and OSM, as well as successive subtractions of the latter cytokines, we were able to determine that IL-17, TNF- α , and OSM are important mediators in the induction of a subset of keratinocyte gene products associated with skin inflammation. The combination of these three cytokines leads to a very strong synergy with maximal values of gene induction of 10^4 - to 10^5 -fold at higher concentrations of cytokines.

Taken together, the results of our study demonstrate that OSM is one of the very few T cell-derived cytokines that is able to directly trigger keratinocyte activation via the recruitment of the STAT3 pathway. Because T cell infiltrates are a major source of OSM, this cytokine, together with an increased expression of its

receptor components in both psoriatic and atopic dermatitic skin, may participate to the phenotype and tissue remodeling observed in these inflammatory skin diseases. Finally, our data show that OSM and its receptor play an important role in cutaneous inflammatory responses in general, whereas its specific effects associated with distinct inflammatory diseases depend on the cytokine environment.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203: 2271–2279.
- Christophers, E., and T. Henseler. 1987. Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 279: S48–S51.
- Nomura, I., E. Goleva, M. D. Howell, Q. A. Hamid, P. Y. Ong, C. F. Hall, M. A. Darst, B. Gao, M. Boguniewicz, J. B. Travers, and D. Y. Leung. 2003. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J. Immunol.* 171: 3262–3269.
- Richards, C. D., T. J. Brown, M. Shoyab, H. Baumann, and J. Gaudie. 1992. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J. Immunol.* 148: 1731–1736.
- Kamiya, A., T. Kinoshita, Y. Ito, T. Matsui, Y. Morikawa, E. Senba, K. Nakashima, T. Taga, K. Yoshida, T. Kishimoto, and A. Miyajima. 1999. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J.* 18: 2127–2136.
- Gearing, D. P., C. J. Thut, T. VandeBos, S. D. Gimpel, P. B. Delaney, J. King, V. Price, D. Cosman, and M. P. Beckmann. 1991. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J.* 10: 2839–2848.
- Gearing, D. P., M. R. Comeau, D. J. Friend, S. D. Gimpel, C. J. Thut, J. McGourty, K. K. Brasher, J. A. King, S. Gillis, and B. Mosley. 1992. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255: 1434–1437.
- Mosley, B., C. De Imus, D. Friend, N. Boiani, B. Thoma, L. S. Park, and D. Cosman. 1996. Dual oncostatin M (OSM) receptors: cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J. Biol. Chem.* 271: 32635–32643.
- Ishihara, K., and T. Hirano. 2002. Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592: 281–296.
- Dillon, S. R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Bilsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S. R. Presnell, H. S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, et al. 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol.* 5: 752–760.
- Bernard, F. X., N. Pedretti, M. Rosdy, and A. Deguercy. 2002. Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis. *Exp. Dermatol.* 11: 59–74.
- Boniface, K., F. X. Bernard, M. Garcia, A. L. Gurney, J. C. Lecron, and F. Morel. 2005. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol.* 174: 3695–3702.
- Sano, S., S. Itami, K. Takeda, M. Tarutani, Y. Yamaguchi, H. Miura, K. Yoshikawa, S. Akira, and J. Takeda. 1999. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J.* 18: 4657–4668.
- Rosdy, M., B. Bertino, V. Butet, S. Gibbs, M. Ponc, and M. Darmon. 1997. Retinoic acid inhibits epidermal differentiation when applied topically on the stratum corneum of epidermis formed in vitro by human keratinocytes grown on defined medium. *In Vitro Toxicol.* 10: 39–47.
- Yssel, H., and H. Spits. 2001. In vitro culture of subpopulations of human T lymphocytes. In *Current Protocols in Immunology*, Green & Wiley, New York. 7–19.
- Trickett, A., and Y. L. Kwan. 2003. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* 275: 251–255.
- Boniface, K., J. C. Lecron, F. X. Bernard, G. Dagregorio, G. Guillet, F. Nau, and F. Morel. 2005. Keratinocytes as targets for interleukin-10-related cytokines: a putative role in the pathogenesis of psoriasis. *Eur. Cytokine Network* 16: 309–319.
- Diveu, C., A. H. Lak-Hal, J. Froger, E. Ravon, L. Grimaud, F. Barbier, J. Hermann, H. Gascan, and S. Chevalier. 2004. Predominant expression of the long isoform of GP130-like (GPL) receptor is required for interleukin-31 signaling. *Eur. Cytokine Network* 15: 291–302.
- Thoma, B., T. A. Bird, D. J. Friend, D. P. Gearing, and S. K. Dower. 1994. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 269: 6215–6222.
- Lew, W., A. M. Bowcock, and J. G. Krueger. 2004. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and 'Type 1' inflammatory gene expression. *Trends Immunol.* 25: 295–305.

21. Finelt, N., A. Gazel, S. Gorelick, and M. Blumenberg. 2005. Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to oncostatin-M. *Cytokine* 31: 305–313.
22. Auguste, P., C. Guillet, M. Fourcin, C. Olivier, J. Veziere, A. Poupard-Barthelaix, and H. Gascan. 1997. Signaling of type II oncostatin M receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 15760–15764.
23. Sano, S., K. S. Chan, S. Carbajal, J. Clifford, M. Peavey, K. Kiguchi, S. Itami, B. J. Nickoloff, and J. DiGiovanni. 2005. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med.* 11: 43–49.
24. Gazel, A., M. Rosdy, B. Bertino, C. Tornier, F. Sahuc, and M. Blumenberg. 2006. A characteristic subset of psoriasis-associated genes is induced by oncostatin-M in reconstituted epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 126: 2647–2657.
25. Roth, J., T. Vogl, C. Sorg, and C. Sunderkotter. 2003. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol.* 24: 155–158.
26. Broome, A. M., D. Ryan, and R. L. Eckert. 2003. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J. Histochem. Cytochem.* 51: 675–685.
27. Sugiura, H., H. Ebise, T. Tazawa, K. Tanaka, Y. Sugiura, M. Uehara, K. Kikuchi, and T. Kimura. 2005. Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *Br. J. Dermatol.* 152: 146–149.
28. Ryckman, C., K. Vandal, P. Rouleau, M. Talbot, and P. A. Tessier. 2003. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 170: 3233–3242.
29. Yoshimura, T., K. Matsushima, S. Tanaka, E. A. Robinson, E. Appella, J. J. Oppenheim, and E. J. Leonard. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9233–9237.
30. Wuyts, A., P. Proost, J. P. Lenaerts, A. Ben-Baruch, J. Van Damme, and J. M. Wang. 1998. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur. J. Biochem.* 255: 67–73.
31. Koch, A. E., S. L. Kunkel, L. A. Harlow, D. D. Mazarakis, G. K. Haines, M. D. Burdick, R. M. Pope, A. Walz, and R. M. Strieter. 1994. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J. Clin. Invest.* 94: 1012–1018.
32. Nickoloff, B. J. 2001. Creation of psoriatic plaques: the ultimate tumor suppressor pathway: a new model for an ancient T-cell-mediated skin disease. *J. Cutan. Pathol.* 28: 57–64.
33. Gallo, R. L., M. Murakami, T. Ohtake, and M. Zaiou. 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110: 823–831.
34. Nizet, V., T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rudisill, R. A. Dorschner, V. Pestonjamas, J. Piraino, K. Huttner, and R. L. Gallo. 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414: 454–457.
35. Glaser, R., J. Harder, H. Lange, J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* 6: 57–64.
36. Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387: 861–861.
37. Harder, J., and J. M. Schroder. 2005. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J. Leukocyte Biol.* 77: 476–486.
38. Howell, M. D., N. Novak, T. Bieber, S. Pastore, G. Girolomoni, M. Boguniewicz, J. Streib, C. Wong, R. L. Gallo, and D. Y. Leung. 2005. Interleukin-10 down-regulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 125: 738–745.
39. Gearing, A. J., N. J. Fincham, C. R. Bird, M. Wadhwa, A. Meager, J. E. Cartwright, and R. D. Camp. 1990. Cytokines in skin lesions of psoriasis. *Cytokine* 2: 68–75.
40. Grossman, R. M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D. P. Murphy, L. T. May, T. S. Kupper, P. B. Sehgal, and A. B. Gottlieb. 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6367–6371.
41. Murphy, J. E., C. Robert, and T. S. Kupper. 2000. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *J. Invest. Dermatol.* 114: 602–608.
42. Teunissen, M. B., C. W. Koomen, R. de Waal Malefyt, E. A. Wierenga, and J. D. Bos. 1998. Interleukin-17 and interferon- γ synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 111: 645–649.

Article 2***Highly differentiated TH17 lymphocytes infiltrate chronically inflamed tissues***

Pène J., Chevalier S., Preisser L., Venereau E., Guilleux M-H., Moles J-P., Danger Y., Ravon E., Le Saux S., Yssel H., Gascan H.

J.Immunol. In press.

1. Identification et caractérisation des cellules Th17 infiltrant les tissus inflammés

Des cellules T CD4⁺ ont été isolées à partir de lésions de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques telles que le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn et également à partir de biopsies bronchiques prélevées à partir de patients atteints d'asthme sévère. En plus des cellules Th1 et Th2 classiques, caractérisées par la production réciproque d'IFN- γ ou d'IL-4, IL-5 et IL-13 respectivement, des cellules T productrices d'IL-17 ont été isolées à partir des sites inflammatoires (Figures 1A et 1B). La production d'IL-17 est inversement corrélée avec la production d'IFN- γ et la production des cytokines associées aux réponses Th2 telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Figure 1C). Aucune corrélation n'a été établie entre les productions d'IL-17 et d'IL-10. A l'inverse, une corrélation positive a été observée entre la production d'IL-17 et la production d'IL-22.

Nous avons ensuite réalisé des analyses par PCR quantitative afin d'identifier des gènes exprimés spécifiquement par les cellules Th17 humaines. Dans un premier temps, nous avons confirmé l'expression de facteurs de transcription spécifiques de chaque sous-population cellulaire (Figure 2). Ainsi, l'expression du facteur T-bet est observée spécifiquement dans les cellules Th1. En ce qui concerne le facteur GATA-3, il est fortement exprimé dans les cellules Th2 mais pas de façon exclusive puisque des quantités non négligeables sont observées dans les cellules Th1 et Th17. Quant à RORC, il est décrit pour être spécifique des cellules Th17 et nous avons effectivement observé une expression de ce facteur qui est restreinte à la sous-population Th17. Des analyses par PCR quantitative nous ont permis de déterminer des gènes exprimés spécifiquement par les cellules Th17 (Figure 3A). Nous avons ainsi identifié différentes cytokines et chimiokines, il s'agit de l'IL-17F, l'IL-22, l'IL-26, du TNF- α , de la lymphotoxine- β et de CCL20 (Figure 3B). Outre l'IL-17F l'expression de CCL20 est la seule expression restreinte aux cellules Th17. Son expression

protéique a été confirmée par un dosage ELISA (Figure 3C). En ce qui concerne les récepteurs de cytokines et de chimiokines exprimés préférentiellement par les cellules Th17, nous avons identifié l'IL-1R1, l'IL-6R, l'IL-23R ainsi que CCR5 et CCR6 (Figure 3D). Les cellules Th17 sont décrites pour répondre à l'IL-23, nous avons donc vérifié la capacité des cellules Th17 isolées à répondre à cette cytokine par des expériences de signalisation cellulaire (Figure 3E). Les expressions de CCR5 et de CCR6 ont également été confirmées par des expériences de cytométrie en flux (Figure 3F).

Nous avons ensuite mis en évidence que l'expression de CCR6 définit les cellules T productrices d'IL-17. En effet, toutes les cellules T CD4⁺ CCR6⁺, isolées à partir d'une lésion psoriasique, produisent des quantités importantes d'IL-17 et d'IL-22 alors que ces deux cytokines ne sont pas produites par les cellules CD4⁺ CCR6⁻ issues de cette même lésion (Tableau I). La fréquence des cellules productrices d'IL-17 infiltrant des tissus inflammés a été déterminée dans différentes pathologies telles que le psoriasis, la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde et l'asthme (Tableau II). Cette fréquence varie entre 10 et 30% selon les pathologies.

2. Les cellules Th1 et Th17 induisent des profils d'expression génique différents sur des kératinocytes inflammatoires

Nous avons ensuite analysé l'effet de surnageants de culture, de lymphocytes T isolés à partir de lésions psoriasiques, afin de déterminer leur capacité à moduler l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, dans des cultures primaires de kératinocytes (Figure 4). Ces surnageants contiennent principalement de l'IFN- γ mais également de l'IL-17, de l'IL-17F, de l'IL-22, du TNF- α , de la lymphotoxine- β et de l'IL-26 (Figure 4A). Ils induisent l'expression de CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8 mais également de CXCL10 et CXCL11 (Figure 4B). Des expériences réalisées à l'aide d'anticorps spécifiques de l'IL-17, du TNF- α ou de l'IFN- γ ont montré que l'induction de ces deux groupes de chimiokines sont sous le contrôle de ces trois cytokines (Figure 4C). Ces observations ont été confirmées en induisant l'expression de ces chimiokines grâce à l'activation des kératinocytes par de l'IL-17, du TNF- α ou de l'IFN- γ recombinants (Figure 4D). De même, l'IL-17 et le TNF- α induisent l'expression de l'IL-1F9 et de la β -défensine-2. De plus, nous avons montré une implication des cellules Th17, et plus particulièrement de l'IL-17 et de l'IL-22, dans l'induction de l'expression de la protéine S100A7 dans des épidermes reconstitués (Figure 5).

Dans cette étude, nous avons donc identifié et caractérisé les cellules Th17 humaines infiltrant les tissus de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques telles que le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn.

Chronically Inflamed Human Tissues Are Infiltrated by Highly Differentiated Th17 Lymphocytes

Jérôme Pène,* Sylvie Chevalier,[†] Laurence Preisser,[†] Emilie Vénéreau,[†] Marie-Hélène Guilleux,[†] Soufiane Ghannam,* Jean-Pierre Molès,[‡] Yannic Danger,[†] Elisa Ravon,[†] Sabine Lesaux,[†] Hans Yssel,^{1*} and Hugues Gascan^{1†}

Chronic inflammatory diseases are characterized by local tissue injury caused by immunocompetent cells, in particular CD4⁺ T lymphocytes, that are involved in the pathogenesis of these disorders via the production of distinctive sets of cytokines. Here, we have characterized single CD4⁺ T cells that infiltrate inflamed tissue taken from patients with psoriasis, Crohn's disease, rheumatoid arthritis, or allergic asthma. Results from a cytokine production and gene profile analysis identified a population of *in vivo* differentiated retinoid-related orphan receptor γ -expressing T cells, producing high levels of IL-17, that can represent up to 30% of infiltrating T lymphocytes. Activated Th17 cells produced IL-26, TNF- α , lymphotoxin- β , and IL-22. IL-17 and IL-22 concentrations secreted by tissue infiltrating Th17 cells could reach up to 100 nM and were inversely correlated with the production of Th1- and Th2-associated cytokines. In addition, tissue-infiltrating Th17 cells are also characterized by high cell surface expression of CCR6, a chemokine receptor that was not expressed by Th1 and Th2 cells, isolated from the same lesions, and by the production of CCL20/MIP3 α , a CCR6 ligand, associated with tissue infiltration. Culture supernatants of activated Th17 cells, isolated from psoriatic lesions, induced the expression of gene products associated with inflammation and abnormal keratinocyte differentiation in an IL-17 and IL-22-dependent manner. These results show that tissue-infiltrating Th17 cells contribute to human chronic inflammatory disease via the production of several inflammatory cytokines and the creation of an environment contributing to their migration and sequestration at sites of inflammation. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 7423–7430.

The CD4⁺ T lymphocytes play a pivotal role in orchestrating the physiopathological immune reactions that underlie the pathogenesis of chronic inflammatory diseases via the production of distinctive sets of cytokines, as well as the expression of cell surface molecules, that are involved in their functional activity (1). Because of the proinflammatory nature of its signature cytokine, IFN- γ , the activity of Th1 lymphocytes has traditionally been linked to the induction and progression of tissue damage that is a common dominator in these diseases, and the pathogenesis of psoriasis vulgaris, rheumatoid arthritis, or Crohn's disease are generally considered to be associated with Th1 type immune responses. Recently, however, a novel subpopulation of mouse memory CD4⁺ T lymphocytes has been identified that produces high levels of IL-17 (2) and results from experimental models of immune-mediated tissue injury have underscored a major role for these so-called Th17 cells in the induction of inflammation and tissue destruction in various disorders, such as experimental autoimmune encephalomyelitis, collagen-induced arthritis, dermal inflammation, and inflammatory bowel disease (3–10). These reports

corroborate results from earlier literature showing an association between the presence of IL-17-producing cells and inflammatory disease (reviews in Refs. 11 and 12).

IL-17 belongs to a recently discovered family of cytokines that contribute to the crosstalk between adaptive and innate immunity (5). IL-17 and its relative IL-17F have strong proinflammatory properties on a broad range of cellular targets, including epithelial and endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, osteoblasts, and monocytes/macrophages (12). In the mouse, IL-17 has been shown to induce the production of the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , the chemokines CCL2 and CCL3, as well as matrix metalloproteases that are effector molecules involved in leukocyte diapedesis and tissue destruction (13). IL-17 also mediates the proliferation, maturation, and chemotaxis of neutrophils (14).

Recently, the identification of peripheral blood-derived (15, 16) human Th17 cells, as well as Th17 cells differentiated *in vitro* from naive peripheral blood T cells (17), has been reported. However, although human T lymphocyte populations with different cytokine production profiles, including Th17 cells, can be obtained following *in vitro* differentiation from naive peripheral blood-derived precursor cells, this approach does incompletely mimic the *in vivo* inflammatory environment that drives the generation and differentiation of those T cells that mediate tissue inflammation, and little information is available on human IL-17-producing effector T cells that infiltrate inflammatory lesions. In the present study, we have phenotypically and functionally characterized *in vivo* differentiated Th17 lymphocytes isolated from inflamed tissues of patients with chronic inflammatory disease.

Materials and Methods

T lymphocyte cultures

In vivo differentiated human T cell populations were directly isolated from biopsies taken from inflammatory sites of patients suffering from chronic

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 844, Montpellier, France; [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité mixte 564, Université d'Angers, Angers, France; and [‡]Institut Universitaire de Recherche Clinique, Montpellier, France

Received for publication October 9, 2007. Accepted for publication March 31, 2008.

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

¹ Address correspondence and reprint requests to Dr. Hugues Gascan, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité mixte 564, Université d'Angers, 49033 Angers Cedex, France. E-mail address: gascan@univ-angers.fr or Dr. Hans Yssel, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 844, 80 Rue Augustin Fliche, Montpellier Cedex 34091, France. E-mail address: hans.yssel@inserm.fr

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/\$2.00

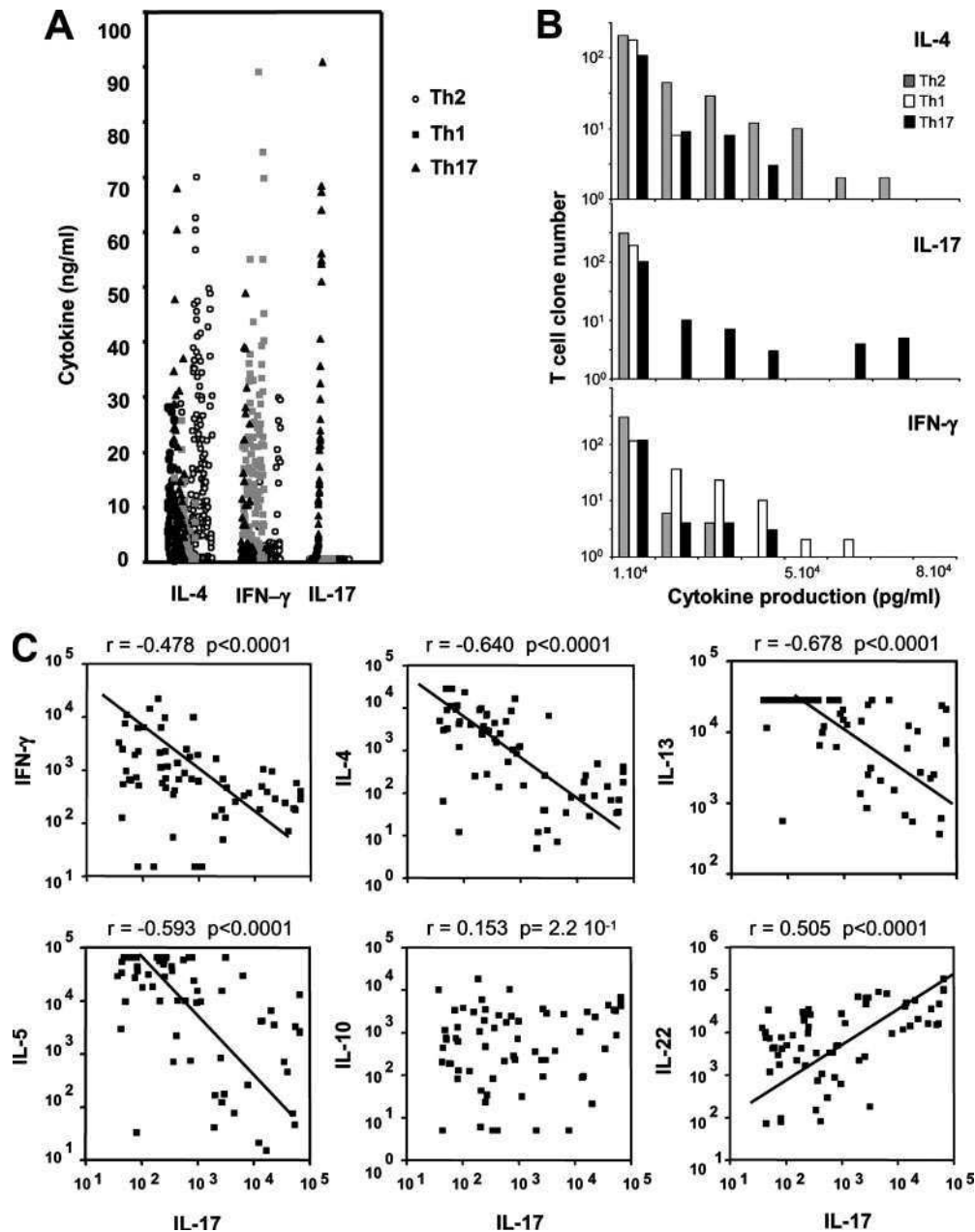


FIGURE 1. Correlations of cytokine production profiles of tissue-infiltrating Th cells. CD4⁺ tissue-infiltrating T cell clones were stimulated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 Abs for 24 h, and the production of cytokines was quantified in the culture supernatants by ELISA. *A*, Analysis of IL-4, IFN- γ , and IL-17 production by Th1, Th2, and Th17 clones. *B*, Number of Th1, Th2, and Th17 clones according to the magnitude of IL-4, IFN- γ , and IL-17 production. *C*, Comparison of IL-17 production with that of the other cytokines (units on *x*- and *y*-axis are in picograms per milliliter). Statistical correlations were determined according to Spearman's rank correlation test, and differences between pairs of cytokines were determined by Student's *t* test.

inflammatory or autoimmune disease. Cutaneous biopsies were obtained from active lesions of patients with psoriasis vulgaris (kindly provided by Dr. Nadia Raison-Peyron, Service de Dermatologie, Hôpital St. Eloi, Montpellier, France), bronchial biopsies from patients during an acute episode of severe asthma (from Dr. Pascal Chanez, Centre Hospitalier de l'Université Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France), intestinal biopsies from patients with active Crohn's disease (from Prof. Jean-Michel Fabre, Service de Chirurgie Digestive, Hôpital St. Eloi), and synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis undergoing surgery for joint replacement (from Dr. François Canovas, Centre Hospitalier de l'Université Lapeyronie, Montpellier, France). All biopsies were obtained after informed consent forms were signed, according to a protocol established by the Ethics Committee of the University Hospitals of Montpellier. Punch biopsies were washed and transferred to a well of a 24-well tissue culture plate (Nunc) in the presence of anti-CD3 and anti-CD28-coated magnetic beads (Ref. 18; Invitrogen) in Yssel's medium (19), supplemented with 1% human AB⁺ serum and 2 ng/ml rIL-2 (R&D Systems). After 3 days of culture, 2 ng/ml rIL-2 were added to the

cultures, and growing T cells were collected after 7–10 days, stained with an anti-CD4 mAb, cloned using a flow cytometer (FACS Vantage; BD Biosciences), and subsequently cultured in the presence of an irradiated feeder cell mixture as described (20), in the presence of rIL-2 (2 ng/ml). From 10 to 14 days later, T cells were collected and used in subsequent experiments.

Keratinocyte cultures and in vitro-reconstituted epidermis

Primary human keratinocytes were cultured in a 12-well plate in keratinocyte growth medium (Promocell) and were used at a concentration of 1.5×10^5 cells/well in experimental procedures. Reconstituted human epidermis was generated as described previously (21).

ELISA

IL-4, IL-5, and IFN- γ production was analyzed by cytokine-specific ELISA, as described (20) or using kits for IL-10, IL-13 (Diaclone), IL-17, IL-22, and MIP-3 α (R&D Systems).

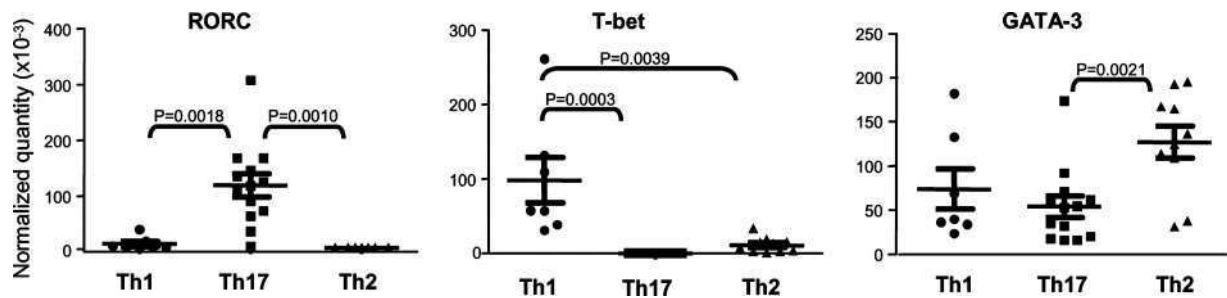


FIGURE 2. IL-17-producing T cell clones express the *RORC* gene product. Tissue-infiltrating T lymphocytes were analyzed for the expression of *RORC*, *T-bet*, and *GATA-3* transcripts by quantitative PCR. *p* values were determined as in Fig. 1.

Immunofluorescence and flow cytometry analysis

Reconstituted epidermis samples were collected and embedded in OCT compound (Miles), frozen in liquid nitrogen-precooled isopentane; and immunofluorescence was analyzed as described (21), using the anti-psoriasis mAb clone 47C1068 (Santa Cruz Biotechnology) in association with a secondary AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen). Flow cytometry analysis of T cells was conducted as described (20), using PE-conjugated anti-CD4, -CCR5, and -CCR6 mAbs or an isotype control mAb (R&D Systems). Cell fluorescence intensity was analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using CellQuest software.

Quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted using an RNeasy microkit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. One microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA using random hexamer primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Primers were designed using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>). PCR amplifications reactions were conducted in duplicate with iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a 15- μ l reaction volume containing 200 nM primers and 5 ng of cDNA, and using a Chromo4 System (Bio-Rad). Thermal cycling was initiated with a 3-min incubation at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 15 s. The ΔC_t method was retained for quantification and *GAPDH*, *HPRT1*, and *HSPCB* house-keeping genes used for multiple normalization as described previously (22).

Western blotting analysis

One million Th17 lymphocytes were incubated for 15 min with rIL-23, rIL-6, rIFN- γ , or rIL-4 (25 ng/ml) and were subsequently lysed in Laemmli loading buffer. Cell lysates were sonicated, submitted to SDS-PAGE gel electrophoresis, and transferred onto an Immobilon P transfer membrane (Millipore). The membranes were incubated overnight with a polyclonal Ab raised specific for phospho-705-Stat3, phospho-701-Stat1, or tubulin, respectively (Cell Signaling Technology) and stained with a HRP-conjugated goat anti-rabbit Ab (Biosource).

Software and statistical analysis

Three-dimensional scatter plots were drawn using Spotfire DecisionSite version 9.0 software. Correlations were determined by Spearman's rank correlation test, and statistical significance was determined by Student's *t* test using GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software). Results were statistically significant for $p \leq 0.05$.

Results

Identification of Th17 cells infiltrating inflamed tissues

CD4⁺ T cells were directly isolated from inflamed lesions of patients with chronic inflammatory disease, including psoriasis vulgaris, rheumatoid arthritis, or Crohn's disease, as well as from bronchial biopsies taken from patients with severe asthma. After cloning by electronic sorting, the cytokine production profiles of >500 in vivo differentiated T cell clones was determined after their activation via CD3 and CD28. In addition to classic Th1 and Th2 cells, characterized by the reciprocal production of IFN- γ or IL-4, IL-5, and IL-13, respectively, IL-17-producing T cells were isolated from the inflammatory sites (Fig. 1, A and B). The use of

short-term culture conditions, in the absence of exogenous polarizing cytokines, allowed a direct ex vivo comparison of production of IL-17 with that of IFN- γ and IL-4. The production of IL-17 was found to inversely correlate with the production of IFN- γ , as well as with the production of the Th2 response-associated cytokines IL-4, IL-5, and IL-13, with *p* values ranging from 10^{-5} to 10^{-10} depending on the studied cytokine (Fig. 1C). A large number of T cell clones producing Th1 or Th2 cytokines, in addition to IL-17, were isolated from inflamed tissue as well. No significant correlation, neither positive nor negative, could be established between the production of IL-17 and that of IL-10 (Fig. 1C). In contrast, however, the production of IL-17 by human CD4⁺ T cells was strongly and quantitatively correlated with that of IL-22 ($p < 2 \times 10^{-5}$; Fig. 1C).

Infiltrating Th17 cells specifically express retinoid-related orphan receptor γ (*RORC*)² transcription factor

Expression of Th lineage-specific transcription factors is a distinctive feature of subpopulations of cytokine-producing T lymphocytes. In the mouse, the nuclear receptor retinoid-related orphan receptor γ (*ROR γ*) has been shown to be necessary and sufficient to control IL-17 transcription and to drive the differentiation of IL-17-producing cells from naive T cells (23). All T cell clones, selected for their high levels of IL-17 and IL-22 production, specifically and constitutively expressed the gene product of *RORC*, the human ortholog of mouse *ROR γ* (Fig. 2; $p < 0.002$). None of these Th17 clones expressed the Th1-specific transcription factor *T-bet* which, as expected, was prominently expressed in the Th1 clones. In contrast, however, the transcription factor *GATA-3* factor was found to be expressed preferentially in Th2 cells and to a lesser level in both Th1 and Th17 populations.

Cytokine and cytokine receptor profile of tissue-infiltrating Th17 cells

To further characterize human tissue-infiltrating Th17 cells, the expression profile of 230 genes corresponding to all known cytokines and chemokines, as well as their respective receptors, was analyzed by quantitative PCR and compared with that of Th1 and Th2 cells activated via CD3 and CD28 ($n = 8$ for each subpopulation). Sixty-six percent of the analyzed genes displayed a similar distribution profile among the three Th lymphocyte lineages (Fig. 3A). The Th17 lymphocytes predominantly expressed 12 genes that were either absent or strongly decreased in Th1 and Th2 lymphocytes. In addition to IL-17 and IL-22 mRNA, a strong expression IL-17F, IL-26, TNF- α , and lymphotoxin (LT)- β transcripts was detected (Fig. 3B). Another gene that was specifically

² Abbreviations used in this paper: *RORC*, retinoid-related orphan receptor γ ; LT, lymphotoxin; *ROR γ* , retinoid-related orphan receptor γ .

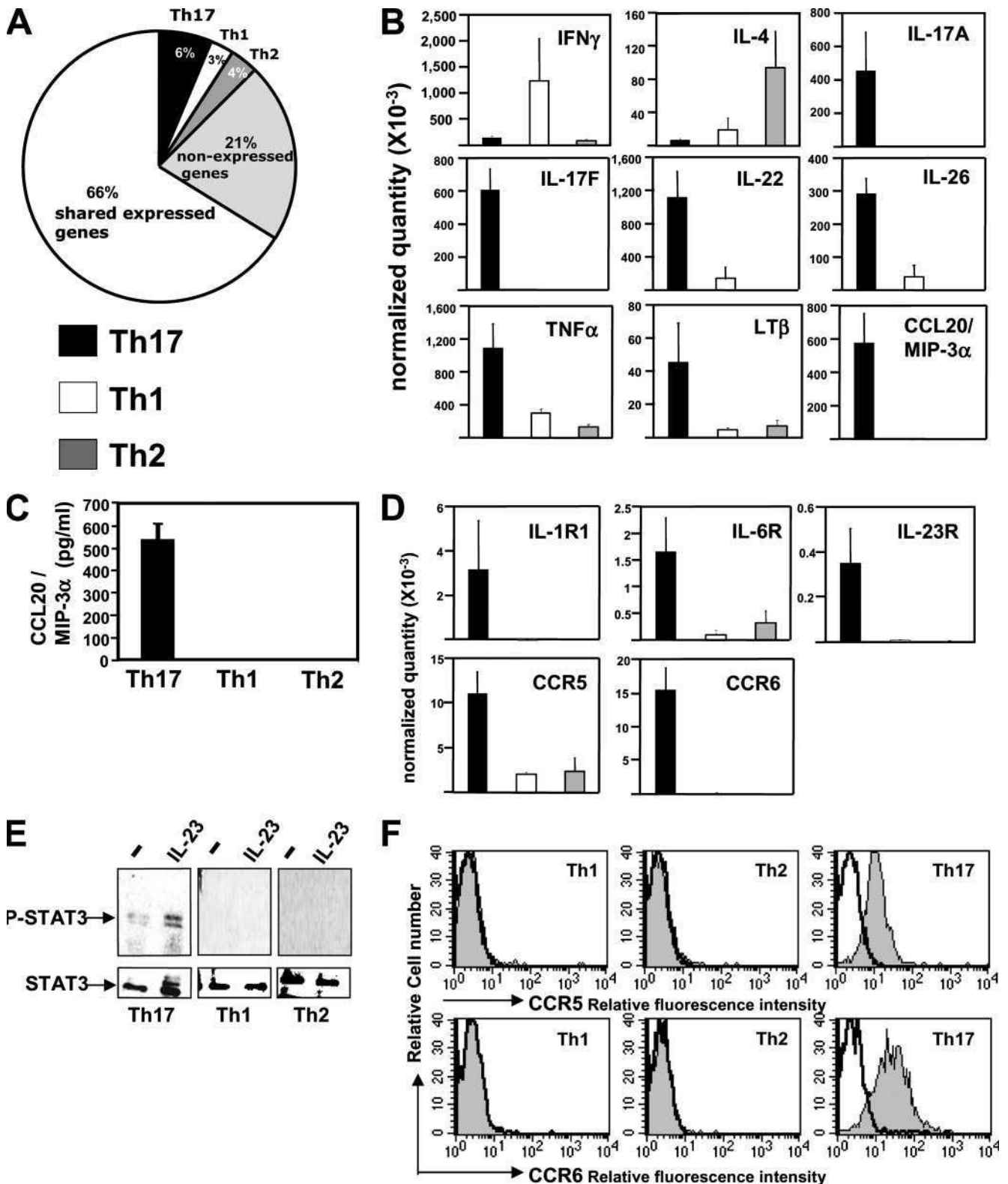


FIGURE 3. Gene expression profile analysis of tissue-infiltrating T lymphocytes. *A*, Relative expression of gene transcripts, based on data normalized with respect to the expression of the *G3PDH* reference gene on highly polarized Th17, Th1, or Th2 clones, derived from various tissues ($n = 8$ in each group), that were activated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs immobilized onto magnetic beads for 6 (*A*, *B*, and *D*) or 24 h (*C* and *F*). mRNA expression of genes encoding cytokines and chemokines (*B*) or their receptors (*D*) was determined by quantitative PCR. *C*, Secretion of CCL20, as quantified by ELISA (mean \pm SD; $n = 4$). *E*, Representative Th1, Th2, and Th17 clones were incubated for 15 min with 25 ng/ml IL-2, and phosphorylation of Stat-3 was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting analysis. *F*, Cell surface clones expression of CCR5 and CCR6, as determined by flow cytometry (representative result of $n = 6$).

expressed by the Th17 but by neither the Th1 nor the Th2 cell clones was the CCR6 ligand CCL20. The exclusive production of this chemokine by human Th17 cells was confirmed at protein

level in the culture supernatants of the latter cells after their activation by via CDC3 and CD28, yet was undetectable in the culture supernatants of the other T cell subpopulations (Fig. 3C).

Table I. Cytokine production profiles of CCR6⁺ and CCR6⁻ T cell clones^a

Clones Tested		Cytokines Produced (ng/ml)						
CCR6	No.	IL-17	IL-22	IL-10	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ
CCR6 ⁺	19	13.5 \pm 17.1 ^b	9.3 \pm 9.2	3.6 \pm 4.8	1.1 \pm 2.0	3.5 \pm 6.2	7.5 \pm 9.4	0.5 \pm 0.7
CCR6 ⁻	10	0.04 \pm 0.05	0.04 \pm 0.03	8.5 \pm 11.4	11.6 \pm 13.8	24.9 \pm 26.6	40.4 \pm 50.2	0.8 \pm 0.9
<i>p</i> value		\leq 0.0001 ^c	\leq 0.001	NS	\leq 0.01	\leq >0.05	\leq 0.05	NS

^a T cells obtained from the skin biopsy of a psoriatic patient were double-stained with an anti-CD4 FITC and an anti-CCR6 PE mAb. CD4⁺CCR6⁺ and CD4⁺CCR6⁻ T cells were cloned using a cell sorter and expanded in culture conditions using IL-2 only as a growth factor. T cell clones were then activated using immobilized anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and the presence of cytokines in the culture supernatants was quantified by ELISA.

^b Mean \pm SD.

^c As determined by the Mann-Whitney nonparametric test. NS: Non-significant.

The cytokine receptor profile showed a preferential expression by Th17 cells of transcripts for the IL-1, IL-6, and IL-23 receptor chains (Fig. 3D). A specific recruitment of the Stat3 signaling pathway was observed in Th17, but neither Th1 nor Th2, cells in response to stimulation with IL-23, thereby demonstrating the functionality of the corresponding receptor (Fig. 3E).

Chemokine receptor expression

Human tissue-infiltrating Th17 cells expressed a distinctive pattern of chemokine receptors. A 5-fold enhanced expression of CCR5 transcripts, as compared with the expression of this chemokine receptor by tissue-infiltrating Th1 and Th2 cells (Fig. 3D), was detected and confirmed by flow cytometry analysis (Fig. 3F). Importantly, however, a strongly enhanced expression of CCR6 transcripts was observed in human Th17 cells (Fig. 3D), which was completely absent from Th1 and Th2 cells. The specific cell surface expression of CCR6 by Th17 cells was confirmed by flow cytometry analysis (Fig. 3F).

CCR6 expression defines IL-17-producing T cells

To determine whether expression of CCR6 on T cells could be used to identify IL-17-producing T cell populations, we sorted and cloned primary CD4⁺ T cells, isolated from an active lesion of psoriatic skin, based on the presence or absence of this chemokine receptor. All CD4⁺CCR6⁺ T cell clones were found to produce high levels of IL-17 and IL-22, whereas these two cytokines were not produced by the CD4⁺CCR6⁻ T clones. Production levels of IL-4, IL-5, and IL-13 by the latter cells were superior to those produced by the CD4⁺CCR6⁺ T cell clones in a statistically significant manner, whereas the production of IL-10 was not statistically different between both populations (Table I).

The frequency of tissue-infiltrating Th17 cells isolated from the various biopsies, as measured by the production of IL-17 and IL-22 by individual T cell clones, was variable and between 10 and

30% of such cells could be detected in addition to IL-4-, IFN- γ -, and IL-10-producing cells (Table II). To validate these results and to exclude any effect of the cloning procedure, primary tissue-infiltrating T cells were propagated for 7 days under neutral culture conditions with anti-CD3/CD28 mAbs in the presence of IL-2 and were analyzed for the expression of CD4 and CCR6 by flow cytometry. Frequencies of CD4⁺CCR6⁺ cells remained stable in the culture and were comparable with those of Th17 clones identified by measuring the production of IL-17 and IL-22 (Table II).

Th1 and Th17 cell cells induce different gene expression profiles in inflammatory keratinocyte differentiation

Mainly based on results from experimental mouse models, inflamed tissue-infiltrating T lymphocytes were until recently considered to be of the Th1 phenotype, with a recent and increasing appreciation for a role for Th17 cells in the tissue destruction that is characteristic for several inflammatory and autoimmune diseases (24). To evaluate the functional activity of Th1 and Th17 lymphocytes in such infiltrates, the relative expressions of Th1 and Th17 cell-associated cytokine transcripts, respectively, were analyzed by quantitative PCR in primary T cells and expanded from a psoriatic skin lesion, and their culture supernatants were analyzed for their capacity to affect the expression of several selected genes, associated with inflammation in primary keratinocytes. In line with the results obtained after the analysis at the single-cell level, described above, psoriatic tissue-infiltrating T cells showed a prominent expression of IFN- γ mRNA and to a somewhat lesser extent those of IL-17, IL-17F, IL-22, TNF, LT, and IL-26 transcripts (Fig. 4A). Culture supernatants, prepared from these cells activated via CD3 and CD28, induced the expression of transcripts for CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, and CXCL8, as well as CXCL10 and CXCL11 in primary keratinocytes (Fig. 4B). The induction of each of these two chemokine receptor-binding ligands was found to be under the control of IL-17 and TNF- α or IFN- γ , respectively, as

Table II. Presence of IL-17-producing cells in inflamed tissues

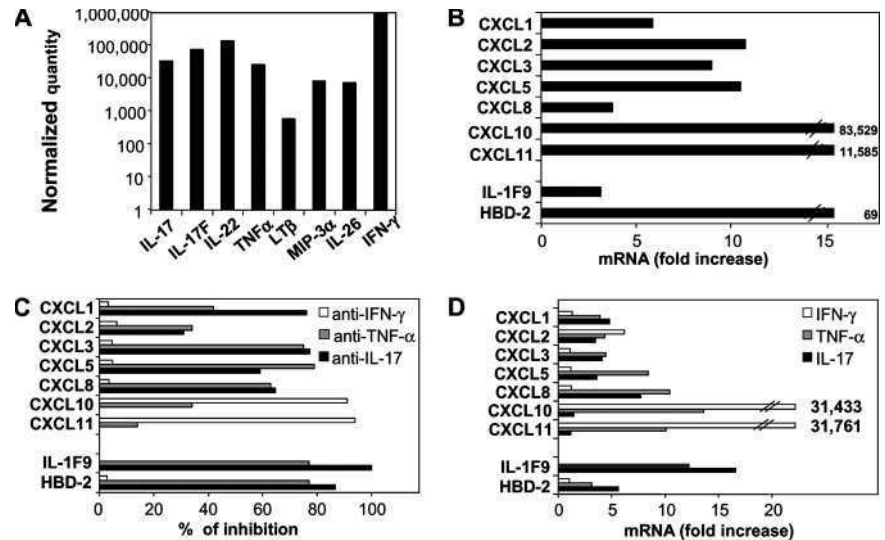
Pathologies	CCR6 ⁺ T Cells (% of CD4 ⁺ Cells) ^a	No. of Tested Clones ^b	Cytokines Produced (% of Producing Clones – Mean Production in ng/ml) ^c				
			IL-17	IL-22	IL-10	IL-4	IFN- γ
Psoriasis	29	183	27% – 12.3	62% – 13.0	53% – 2.5	88% – 4.0	68% – 0.9
Crohn's disease	21	97	29% – 28.1	67% – 7.5	45% – 4.2	84% – 10.2	89% – 5.6
Rheumatoid arthritis	10	78	13% – 1.9	41% – 6.3	37% – 1.4	87% – 7.9	100% – 12.8
Asthma	18	210	21% – 19.9	74% – 15.7	61% – 3.8	93% – 11.2	90% – 5.8

^a Tissue-infiltrating T lymphocytes were isolated from biopsies taken from various inflammatory pathologies (two patients in each group except for bronchial asthma: *n* = 3) and expanded in culture conditions using IL-2 only as a growth factor. After a 2-wk culture period, the frequency of CD4⁺CCR6⁺ T cells was estimated by double immunofluorescence and FACS.

^b In parallel, resting T cells were cloned, and the clones were expanded for an additional period of 15 days in IL-2 alone.

^c T cell clones were activated using immobilized anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and the presence of Th17-, Th2-, and Th1-associated cytokines, as well as IL-10, in the culture supernatants was quantified by ELISA. For each cytokine analyzed, the values represent the percentage of cells producing this cytokine. Numbers in parentheses, mean amount (nanograms per milliliter) produced by the cells.

FIGURE 4. Th17 cells induce the expression of gene products associated with inflammation in primary keratinocytes. *A*, Expression of cytokine and chemokine transcripts in activated psoriatic lesion-infiltrating T lymphocytes, as determined by quantitative PCR. The effect of culture supernatants of these T lymphocytes (10% v/v), activated for 24 h via CD3 and CD28, in the absence (*B*) or presence (*C*) of neutralizing anti-IL-17, TNF- α , or IFN- γ mAbs or the direct effect of recombinant cytokines (10 ng/ml; *D*) on the expression of the CXCR2 and CXCR3 ligands, IL-1F9 and β -defensin 2 (HBD-2), in primary keratinocytes was measured by quantitative PCR. SD was <10% of two independent experiments.



shown by the effect of neutralizing Abs specific for these cytokines (Fig. 4C), as well as the addition of the recombinant cytokines themselves (Fig. 4D). Moreover, IL-17, but not IFN- γ , in these culture supernatants also induced the expression of transcripts for IL-1F9, an IL-1 family member expressed by keratinocytes, and of human β -defensin 2 (Fig. 4B). Finally, culture supernatants generated from T cell clones derived from this psoriatic skin-infiltrating T cells were tested for their ability to induce the expression of S100A7-psoriasis, an inflammation-associated protein that is strongly expressed in psoriatic skin. Th17 cell-derived culture supernatants strongly induced the expression of S100A7-psoriasis which was dependent on the action of both IL-17 and IL-22 (Fig. 5), given that the depletion of both cytokines using neutralizing mAb abolished this effect. The use of recombinant cytokines confirmed that IL-17 and IL-22 acted in a synergistic manner, whereas, in contrast, IFN- γ had only minimal effects. Keratinocyte maturation during the 4 days of culture remained unchanged, as shown by staining with an anti-involucrin mAb (results not shown).

Discussion

In this present study, we have characterized CD4⁺ tissue-infiltrating human Th17 cells isolated from inflamed sites of patients with chronic inflammatory disease by comparing their gene expression profile with that of Th1 and Th2 cells isolated from the same

lesions and generated under identical experimental conditions. After a single stimulation via CD3 and CD28, these cells were expanded under neutral culture conditions in the presence of IL-2 and single cloned cells were classified, according to their cytokine production profile, into different Th subpopulations. In agreement with the notion that the inflammatory environment contains T cells producing not only inflammatory but also anti-inflammatory, cytokines, production of IFN- γ , IL-4, and IL-17 was observed among the more than 500 CD4⁺ T cell clones that were analyzed.

It has been hypothesized, based on the evidence of independent regulation of each cytokine gene, that cytokine-producing effector cells display a spectrum of cytokine profiles of which Th1 and Th2 cells are only two possible extremes, thereby representing the universal end points of continued Ag exposure (25). In agreement with this notion, many tissue-infiltrating T cells were found to be heterogeneous in the number and the cytokine combinations that they produce, independent of the type of inflammatory sites the cells were isolated from. However, T cell clones producing combinations of cytokines were generally those with low production levels, whereas the degree of polarization increased with T cell clones producing higher cytokine levels of IL-4, IFN- γ , or IL-17. In this respect, in contrast to *in vitro* differentiated peripheral blood-derived Th17 cells that were reported to produce both IFN- γ and IL-17 (16, 17), many of the IL-17-producing T cell clones

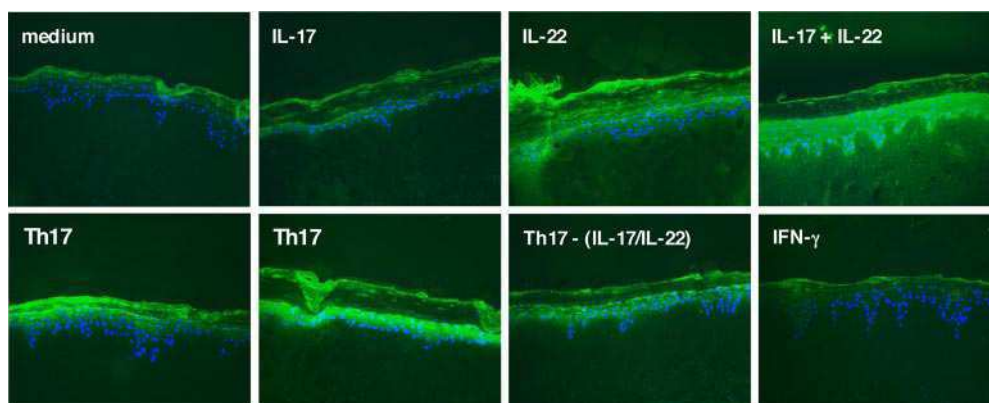


FIGURE 5. IL-17 and IL-22 produced by Th17 cells induce, in a synergistic manner, the expression of S100A7 in reconstituted human epidermis. Reconstituted human epidermis was incubated in medium only or with 10 ng/ml rIL17 and rIL-22, alone, in combination, or with 10 ng/ml rIFN- γ , with 10% (v/v) of the culture supernatant of two anti-CD3-CD28 mAb-activated tissue-derived Th17 clones, and one of these culture supernatants was depleted for the presence of IL17 and IL-22. After 4 days, the expression of S100A7 was determined by immunofluorescence analysis.

isolated from chronically inflamed lesions did produce only very weak levels of IFN- γ , IL-4, or other Th2-associated cytokines, whereas IL-17 and the Th17-associated cytokine IL-22 were produced at much higher levels by the latter cells and could reach up to nanomolar range concentrations. An inverse correlation between IL-17 and IFN- γ production was also observed when comparing the production of both cytokines by all CD4⁺ T cell clones isolated from different inflamed sites. Low frequencies of Th17 clones isolated from biopsies of patients with rheumatoid arthritis were accompanied by a high frequency of IFN- γ -producing cells, whereas the opposite situation was observed for T cells isolated from biopsies from the other inflammatory disease types (Table II). The lower frequency of Th17 cells isolated from synovial biopsies could be due to the clinical status of the disease, given that they were taken from patients undergoing joint replacement who generally present lower inflammatory symptoms at that stage of the disease. These results indicate that the cytokine profile of Th17 cells, derived from either peripheral blood cells or infiltrating patient tissues (15–17), express similar signatures but that a part of tissue-infiltrating Th17 is strongly polarized with very high secretion levels of Th17-type cytokines, most likely reflecting the chronic and repetitive activation of this cell lineage at the inflammatory site. The polarized phenotype of these Th17 cells was furthermore underscored by their specific expression of the human ortholog of ROR γ t, RORC, irrespective of the type of disease they were generated from, unlike peripheral blood-derived Th17 cell clones that were reported to express both RORC and the Th1 cell-specific transcription factor t-bet (16).

The production of IL-17 by tissue-infiltrating Th17 cells was strongly associated with that of IL-22, a class II cytokine belonging to the IFN-IL-10 family of cytokines (review in Ref. 26). These results confirm previously published studies showing that IL-22 is produced preferentially by activated mouse (27) as well as human (16) Th17 lymphocytes. However, and as reported in the mouse (27), it is shown here that the production of human IL-22 is also not restricted to IL-17-producing cells, because not only Th1, but also Th2 cells were found to produce this cytokine, albeit at much lower levels (data not shown). The general conclusion therefore is that whereas the production of IL-17 is strongly correlated with that of IL-22, the production of the latter cytokine is not always correlated with that of IL-17. IL-22 has initially been identified as an inflammatory cytokine, able to induce the production of acute-phase reactant by hepatocytes (28). IL-22 also has strong inflammation-inducing effects on keratinocytes of IL-22 (29), and it was reported very recently that IL-22 mediates dermal inflammation and acanthosis of mouse epidermis (9). Indeed, culture supernatants derived from an activated Th17 clone, isolated from a psoriatic lesion, strongly induced the expression of psoriasin or S100A7, a proinflammatory protein belonging to the S100 family of calcium-binding proteins, in reconstituted human epidermis in an IL-22-dependent manner. Interestingly, whereas IL-17 used alone had little effect, it strongly enhances, in a synergistic manner, IL-22 mediated induction of S100A7 protein expression in reconstituted epidermis.

Th17 cells also express increased levels of transcripts for IL-26, a proinflammatory cytokine belonging, like IL-22, to the IFN-IL-10 family. Little is known on the biology of IL-26 other than that it targets colon epithelial cells and that it is likely to be involved in mucosal immunity (30). Finally, the finding that Th17 cells also express strongly enhanced transcripts for the proinflammatory genes, *TNF- α* and *LT- β* , generally thought to be associated with Th1 lymphocyte responses, further points to the inflammatory capacity of these cells and their potential for tissue destruction.

Culture supernatants, derived from activated psoriatic skin-infiltrating T cells induced the expression of transcripts for the CXCR2-binding chemokines, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, and CXCL8, as well as the CXCR3 ligands CXCL10 and CXCL11 in primary keratinocytes. All CXCR2-binding chemokines are strong chemotactic factors for neutrophils, whereas CXCR3 is specifically expressed on Th1 cells that via the production of IFN- γ favor their own recruitment into the inflammatory sites. The induction of each of these two chemokine receptor-binding ligands on keratinocytes is under the control of IL-17 and TNF- α or IFN- γ , respectively (31, this study), thereby functioning as a positive feedback loop for the recruitment of inflammatory cells. Furthermore, these results show that tissue-infiltrating Th1 and Th17 cells differ in their chemokine expression-inducing activity on keratinocytes, the latter subpopulation essentially reinforcing the recruitment of neutrophils and macrophages to the site of inflammation via its effect on CXCR2.

Among the various chemokine receptors that were analyzed, transcripts for CCR5 were strongly enhanced in Th17 cells, as compared with Th1 and Th2 cells, which was confirmed by a strong expression at the cell surface of these cells. This contrasts with data from previous studies in the literature, in which the expression of CCR5 has been reported to be specific for Th1 lymphocytes (32). However, these results were obtained with rather ill-defined in vitro differentiated Th1 cell clones and, similar to the reported in vitro differentiated IFN- γ -producing Th17 cells, probably do not reflect the polarized in vivo differentiated cell populations described here. Moreover, although T cells infiltrating the synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis were found to express CCR5 (32), in the light of emerging knowledge on the involvement of T cell subpopulations in inflammatory disease, these synovium-infiltrating cells might represent Th17, rather than Th1 lymphocytes. In contrast, a strongly enhanced and specific expression of CCR6 by human Th17 cells was observed which is in keeping with results from recently published reports (15–17, 33) and which shows that this chemokine receptor can be considered as a cell surface marker for the identification of Th17 cells. CCR6 is a receptor that mediates leukocyte homing to skin and mucosal tissue (34). Moreover, its ligand, CCL20, triggers integrin-dependent arrest of memory, but not naive, CD4⁺ T cells onto endothelial cells, thereby controlling lymphocyte-endothelial cell recognition and recruitment of CCR6-expressing T cells (35). CCL20, which is constitutively expressed in normal skin and mucosa-associated tissues, is up-regulated by IL-17 (36). Activated Th17 cells were found to express strongly enhanced transcription levels of CCL20, and the exclusive production of this chemokine by human Th17 cells was confirmed at protein level in their culture supernatants. The results are in line with the observation that CCL20 and its receptor CCR6 are markedly up-regulated in inflammatory lesions such as those observed in psoriasis (36). The finding that activated human tissue-infiltrating Th17 cells not only express CCR6 but also produce its ligand CCL20 suggests that these cells create a particular inflammatory environment favoring their own migration and sequestration and therefore the perpetuation of chronic inflammatory disease.

Taken together, the results from the present study demonstrate that tissue-infiltrating Th17 lymphocytes are highly differentiated cells with a particular and restricted cytokine secretion profile. Because the IL-22R, IL-17R, TNFRs, and possibly IL-26R are expressed in a wide range of tissue-resident cells, including keratinocytes, fibroblasts, epithelial cells, astrocytes, and synoviocytes (37, 38), they are likely to be the targets of the deleterious effects of Th17 lymphocytes. Furthermore, the capacity of IL-17 to induce

the production of both ligands for the Th17 cell-specific chemokine receptor CCR6, CCL20 (39), and β -defensin-2 (40), as well as the expression of the Th1 cell-specific CXCR3 agonists CXCL9, CXCL10, and CXCL11 (41), indicates that this cytokine creates a positive feedback mechanism that further attracts Th17 as well as Th1 cells to the site of inflammation.

Acknowledgments

We thank Drs. Pascal Chanez, Nadia Raison-Peyron, Michel Veyrac, Professor Jean-Michel Fabre, and Professor François Canovas, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, for providing biopsies from patients with inflammatory disease; Hélène Libouban and Daniel Chappard, Faculté de Médecine, Angers, for technical advice; and Jean-Philippe Giot for expert help with data treatment and presentation.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- O'Garra, A., and P. Vieira. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* 10: 801–805.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201: 233–240.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 11: 1133–1141.
- Cua D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, et al. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744–748.
- Stumhofer, J. S. A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, A. V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehly, et al. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* 7: 937–945.
- Hirota, K., M. Hashimoto, H. Yoshitomi, S. Tanaka, T. Nomura, T. Yamaguchi, Y. Iwakura, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi. 2007. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.* 204: 41–47.
- Sato, K., A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, et al. 2006. *J. Exp. Med.* 203: 2673–2682.
- Chan, J. R., W. Blumenschein, E. Murphy, C. Diveu, M. Wiekowski, S. Abbondanzo, L. Lucian, R. Geissler, S. Brodie and A. B. Kimball. 2006. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J. Exp. Med.* 203: 2577–2587.
- Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang. 2007. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445: 648–651.
- Yen, D., J. Cheung, H. Scheerens, F. Poulet, T. McClanahan, B. McKenzie, M. A. Kleinschek, A. Ouyang, J. Mattson, W. Blumenschein, et al. 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest.* 116: 1310–1316.
- Fossiez, F., J. Banchereau, R. Murray, C. Van Kooten, P. Garrone, and S. Lebecque. 1998. Interleukin-17. *Int. Rev. Immunol.* 16: 541–551.
- Weaver, C. T., R. D. Hatton, P. R. Mangan, and L. E. Harrington. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 821–852.
- Kolls, J. K., and A. Linden. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467–476.
- Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, et al. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* 183: 2593–2603.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8: 639–646.
- Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, et al. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204: 1849–1861.
- Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, et al. 2007. Development, cytokine profile, and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 8: 950–957.
- Pène, J., M. Rahmoun, S. Temmerman, and H. Yssel. 2003. Use of anti-CD3/CD28 mAb coupled magnetic beads permitting subsequent phenotypic analysis of activated human T cells by indirect immunofluorescence. *J. Immunol. Methods* 283: 59–66.
- Yssel, H., J. E. De Vries, M. Koken, W. Van Blitterswijk, and H. Spits. 1984. A serum-free medium for the generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J. Immunol. Methods* 72: 219–227.
- Lecart, S., V. Boulay, N. Raison-Peyron, J. Bousquet, L. Meunier, H. Yssel, and J. Pène. 2001. Phenotypic characterization of human CD4⁺ regulatory T cells obtained from cutaneous dinitrochlorobenzene-induced delayed type hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol.* 117: 318–325.
- Moles, J. P., J. T. Schiller, A. Tesniere, I. M. Leigh, J. J. Guilhou, and N. Basset-Seguin. 1994. Analysis of HPV16 E6 and mutant p53-transfected keratinocytes in reconstituted epidermis suggests that wild-type p53 inhibits cytokeratin 19 expression. *J. Cell Sci.* 107: 435–441.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034. Epub 2002.
- Ivanov, I. I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126: 1121–1133.
- Steinman, L. 2007. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13: 139–145.
- Kelso, A. 1995. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol. Today* 16: 374–379.
- Wolk, K., and R. Sabat. 2006. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17: 367–380.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203: 2271–2279.
- Dumoutier, L. E. Van Roost, D. Colau, and J. C. Renauld. 2000. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10144–10149.
- Boniface, K., F. X. Bernard, M. Garcia, A. L. Gurney, J. C. Lecron, and F. Morel. 2005. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol.* 174: 3695–3702.
- Hör, S., H. Pirzer, L. Dumoutier, F. Bauer, S. Wittmann, H. Sticht, J.-C. Renauld, R. de Waal Malefyt, and H. Fickenscher. 2004. The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J. Biol. Chem.* 279: 33343–33351.
- Rottman, J. B., T. L. Smith, K. G. Ganley, T. Kikuchi and J. G. Krueger. 2001. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin α _E β ₇ in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Lab. Invest.* 81: 335–347.
- Loetscher, P., M. Uguccioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, and J. M. Dayer. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391: 344–345.
- Singh, S. P., H. H., Zhang, J. F., Foley, M. N. Hedrick, and J. M. Farber. 2008. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J. Immunol.* 180: 214–221.
- Allen, S. J., S. E. Crown, and T. M. Handel. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 787–820.
- Campbell, J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. Siani, D. Thompson, and E. Butcher. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279: 381–384.
- Homey, B., M. C. Dieu-Nosjean, A. Wiesenborn, C. Massacrier, J. J. Pin, E. Oldham, D. Catron, M. E. Buchanan, A. Müller, R. de Waal Malefyt, et al. 2000. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol.* 164: 6621–6632.
- Ikeuchi, H., T. Kuroiwa, N. Hiramatsu, Y. Kaneko, K. Hiromura, K. Ueki, and Y. Nojima. 2005. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* 52: 1037–1046.
- Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, and R. Sabat. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21: 241–254.
- Yang, D., O. Chertov, S. Bykovskaia, Q. Chen, M. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. Schröder, J. Wang, O. Howard, and J. Oppenheim. 1999. β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525–528.
- Kao, C. Y., F. Huang, Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, C. Kim, L. Tam, and R. Wu. 2005. IL-17 markedly up-regulates β -defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF- κ B signaling pathways. *J. Immunol.* 175: 6676–6685.
- Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, et al. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat. Immunol.* 8: 369–377.

**THESE DE DOCTORAT
EMILIE VENEREAU**

**INSERM U564, CHU
4, rue Larrey, Bâtiment Monteclair
49933 ANGERS CEDEX 9**

Titre :

GENERATION ET ANALYSE FONCTIONNELLE D'ANTAGONISTES DE L'ONCOSTATINE M ET DE L'INTERLEUKINE-31, CYTOKINES IMPLIQUEES DANS L'INFLAMMATION CUTANEE ET DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL.

Résumé :

L'oncostatine M (OSM) et l'interleukine-31 (IL-31), cytokines de la famille de l'IL-6, sont impliquées dans l'inflammation cutanée associée à des pathologies telles que la dermatite atopique ou le psoriasis. Dans une perspective thérapeutique, deux premières études sont basées sur la génération d'antagonistes agissant comme des récepteurs solubles et destinés à piéger ces cytokines. Afin de disposer d'un nouveau modèle d'étude de l'IL-31 *in vivo*, nous avons également identifié et cloné cette protéine chez le rat. Dans une dernière étude, nous avons mis en évidence l'implication de l'IL-31 dans le développement tumoral en démontrant son activité cytostatique sur certaines lignées tumorales, de manière similaire à l'OSM. Cette étude nous a également amenés à analyser les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans ces effets anti-tumoraux et nous avons ainsi démontré l'activation d'un nouveau facteur de transcription en réponse à ces deux cytokines.

Mots clés :

cytokine, antagoniste, interleukine-31, oncostatine M, signalisation, cancer.

Title :

GENERATION AND CHARACTERIZATION OF ONCOSTATIN M AND INTERLEUKIN-31 ANTAGONISTS, CYTOKINES INVOLVED IN SKIN INFLAMMATION AND TUMORAL DEVELOPMENT

Abstract:

Oncostatin M (OSM) and interleukin-31 (IL-31), cytokines of the IL-6 family, are involved in inflammation associated with skin diseases such as atopic dermatitis or psoriasis. In a therapeutic perspective, two first studies were based on the generation of antagonists acting as soluble receptors and intended to trap these cytokines. In order to have a new model for the IL-31 *in vivo* study, we also identified and cloned this protein in rat. In a latest study, we highlighted IL-31 involvement in tumor development by demonstrating its cytostatic activity on tumor cell lines, in a similar way to OSM. This study has also led us to analyze the intracellular signaling pathways involved in these anti-tumor effects and we demonstrated the activation of a new transcription factor in response to these two cytokines.

Key words:

Cytokine, antagonist, interleukin-31, oncostatin M, signaling, cancer.