

Université de Montréal

# **Étude de nouveaux complexes impliquant l'IL-6 et CLCF1**

par

Salma Chehboun

Département de Pharmacologie, Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Docteur  
en Pharmacologie

Novembre, 2016

© Salma Chehboun, 2016

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Étude de nouveaux complexes impliquant l'IL-6 et  
CLCF1**

Présentée par

Salma Chehboun

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Audrey Claing, président-rapporteur

Dr. Jean-François Gauchat, directeur de recherche

Dr. Mohamed Benderdour, membre du jury

Dr. Ilangumaran Subburaj, examinateur externe

Dr. Pierre Haddad, représentant du doyen

## Résumé

Plusieurs recherches s'adressent à étudier les nouvelles interactions qui peuvent avoir lieu entre les différentes sous-unités des cytokines ainsi que les récepteurs associés. L'objectif général de la thèse est d'étudier la formation de nouveaux complexes impliquant le récepteur soluble EBI3 et la cytokine CLCF1, déterminer leurs voies de signalisation et examiner l'impact de ces interactions sur l'induction de nouvelles fonctions biologiques.

EBI3 est un récepteur soluble qui participe à la formation de trois cytokines composites: IL-27 (EBI3/p28), IL-35 (EBI3/p35) et IL-39 (EBI3/p19). Celles-ci appartiennent à la famille IL-12 des cytokines. L'IL-27 est une cytokine pléiotropique qui exerce à la fois des fonctions pro-inflammatoires qui se caractérisent principalement par la différenciation des cellules Th1 et des fonctions anti-inflammatoires associées à l'inhibition de la différenciation des cellules Th17 et à la production du GM-CSF. L'IL-35 est une cytokine connue pour induire des effets immunosuppresseurs tandis que l'IL-39 a été récemment identifiée pour induire l'inflammation chez les souris atteintes du lupus. Étant donné que l'EBI3 ne forme pas des complexes covalents avec les sous-unités p28, p35 et p19, nous avons voulu savoir si les effets d'EBI3 pourraient passer par la formation d'un composé différent des cytokines IL-27, IL-35 et IL-39. Nous avons démontré que l'EBI3 induit une trans-signalisation en formant un complexe alternatif avec l'IL-6. Des effets similaires de type pro-inflammatoire ont été observés avec les complexes IL-6/sIL-6R $\alpha$  et EBI3/IL-6. En effet, les deux cytokines activent la chaîne gp130, induisent la phosphorylation de STAT3 et augmentent l'expression des chimiokines par les cellules endothéliales humaines.

CLCF1 appartient à la famille IL-6 des cytokines monomériques. L'efficacité de la sécrétion du CLCF1 augmente en présence du CLF, un récepteur soluble aux cytokines. Des mutations dans les gènes codant pour CLCF1 ou CLF induisent le syndrome de la transpiration induite par le froid appelé "Crisponi" ou "CISS". La liaison entre le CNTF, une cytokine qui peut avoir des effets protecteurs semblables au CLCF1 au niveau du système nerveux central, et l'apolipoprotéine E a été observée *in vitro* (1). Nous avons émis l'hypothèse que CLCF1 pourrait également former un complexe avec l'apoE. Nous avons démontré que CLCF1 se lie avec les différentes isoformes d'apoE, à savoir, apoE2, apoE3 et apoE4. L'apoE est une protéine

impliquée dans le transport des lipides et qui se trouve principalement à la surface des chylomicrons, VLDL et une fraction des HDL. Nous avons observé que CLCF1 interagit avec les lipoprotéines en présence et absence d'apoE. L'impact de la liaison du CLCF1 avec l'apoE ou avec les lipoprotéines a été examiné sur les cellules qui expriment la chaîne CNTFR $\alpha$ .

**Mots-clés :** EBI3, IL-6, IL-6R $\alpha$  soluble, trans-signalisation, inflammation, cellules endothéliales, apoE, CLCF1, lipoprotéines

## Abstract

Several researches aimed to study new interactions that take place between the different subunits of cytokines and related receptors. The general goal of this thesis is to study the formation of new complexes involving the soluble receptor EBI3 and the cytokine CLCF1, determine their signaling pathways, and examine the impact of these interactions on the induction of new biological functions.

EBI3 is a soluble receptor participating in the formation of three composite cytokines: IL-27 (EBI3/p28), IL-35 (EBI3/p35), and IL-39 (EBI3/p19). These cytokines belong to the IL-12 family. IL-27 is a pleiotropic cytokine that exerts both pro-inflammatory functions characterized by the differentiation of Th1 cells, and anti-inflammatory functions associated with the inhibition of Th17 cells differentiation and the production of GM-CSF. IL-35 is known to induce an immunosuppressive effects while IL-39 has recently been identified to induce inflammation in mice with lupus. Since EBI3 doesn't form a covalent complexes with p28, p35 and p19 subunits, we wanted to know if the effects of EBI3 could go through the formation of a different compound than that of IL-27, IL-35 and IL-39. We have shown that EBI3 induces a trans-signaling pathway by forming a complex with IL-6. Both IL-6/sIL-6R $\alpha$  and EBI3/IL-6 complexes share similar pro-inflammatory effects. Indeed, both cytokines activate gp130 chain, induce phosphorylation of STAT3, and increase the expression of chemokines by human endothelial cells.

CLCF1 belongs to the IL-6 family of monomeric cytokines. CLCF1 is efficiently secreted in the presence of CLF, a soluble cytokine receptor. Mutations in the genes coding for CLCF1 or CLF cause the cold-induced sweating syndrome also called "Crisponi" or "CISS". The interaction between CNTF, a cytokine which may have similar protective effects as CLCF1 at the central nervous system, and apolipoprotein E was observed *in vitro* (1). We hypothesized that CLCF1 could also form a complex with apoE. We demonstrated that CLCF1 binds with different apoE isoforms, namely, apoE2, apoE3, and apoE4. ApoE is a protein involved in lipid transport and is located primarily on the surface of chylomicrons, VLDL, and a fraction of HDL. We observed that CLCF1 interacts with lipoproteins in the presence and absence of apoE. The

impact of CLCF1 interaction with apoE or lipoproteins was examined on cells expressing the chain CNTFR $\alpha$ .

**Keywords** : EBI3, IL-6, soluble IL-6R $\alpha$ , trans-signaling, inflammation, endothelial cells, apoE, CLCF1, lipoproteins

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des figures .....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi
Chapitre I : Revue de littérature.....	1
1. Le système immunitaire.....	1
1.1. Aperçu général.....	1
1.2. La réponse immunitaire innée.....	2
1.3. La réponse immunitaire adaptative.....	3
2. Les cytokines .....	6
2.1. Généralité.....	6
2.2. La famille des cytokines hématopoïétiques classe I .....	7
2.3. Les récepteurs des cytokines classe I.....	8
2.4. La voie de signalisation des cytokines hématopoïétiques classe I.....	10
2.4.1. La Voie JAK/STAT .....	10
2.4.2. La régulation négative de la voie JAK/STAT.....	11
2.4.3. Les voies MAPK et PI3K .....	13
3. La famille IL-6/IL-12 des cytokines.....	15
3.1. Aperçu général.....	15
3.2. Sites d'interaction entre les cytokines et les récepteurs de la famille IL-6/IL-12 .....	16
3.3. Interleukine-6.....	19
3.3.1. Identification et profil d'expression.....	19
3.3.2. La signalisation classique de l'IL-6.....	19
3.3.3. La trans-signalisation de l'IL-6 .....	20
3.3.4. Stratégies d'étude de la signalisation classique et trans-signalisation de l'IL-6 .....	21
3.3.5. L'IL-6 : une cytokine à rôles multiples .....	24

3.3.5.1. Effets régénérateurs et protecteurs de l'IL-6 .....	24
3.3.5.2. Effets pro-inflammatoires de l'IL-6 .....	25
3.3.5.2.1. Coordination entre le système inné et acquis et recrutement des cellules T .....	25
3.3.5.2.2. Activation des cellules B .....	25
3.3.5.2.3. Régulation de la réponse des cellules Th auxiliaires .....	25
3.3.5.2.4. La réponse des cellules T régulatrices .....	26
3.3.5.2.5. Le métabolisme et la résistance à l'insuline .....	26
3.3.5.2.5. Autres rôles attribués à d'IL-6 .....	27
3.3.6. Approches thérapeutiques ciblant l'IL-6 .....	29
3.4. Interleukine-27 .....	32
3.4.1. Identification et caractéristiques structurales de la sous-unité EBI3 et p28 de l'IL-27 .....	32
3.4.2. Structure et profil d'expression du récepteur d'IL-27 .....	33
3.4.3. La voie de signalisation activée par l'IL-27 .....	34
3.4.4. Les activités biologiques associées à l'IL-27 .....	34
3.4.4.1. La réponse immunitaire Th1 .....	34
3.4.4.1. La réponse immunitaire Th2 .....	36
3.4.3.2. La réponse immunitaire Th17 .....	36
3.4.3.3. La réponse immunitaire T régulatrice .....	36
3.4.3.4. La réponse TCD8 <sup>+</sup> cytotoxique .....	37
3.4.3.5. L'activation des cellules B .....	37
3.4.3.6. La réponse immunitaire innée .....	38
3.4.5. Le rôle de la sous-unité p28 indépendant de l'IL-27 .....	39
3.4.6. L'utilisation de l'IL-27 dans les approches thérapeutiques .....	41
3.5. Interleukine-35 .....	42
3.5.1. Identification et caractéristiques structurales de la sous-unité p35 .....	42
3.5.2. Expression et caractéristiques structurales du récepteur de l'IL-35 .....	43
3.5.3. Activités biologiques de l'IL-35 .....	44
3.5.3.1. La régulation des cellules T .....	44
3.5.3.1. La régulation des cellules B .....	45



3.5.4. L'utilisation de l'IL-35 dans les approches thérapeutiques .....	46
3.6. CLCF1 et son partenaire CLF .....	46
3.6.1. Identification et profil d'expression .....	46
3.6.2. Le récepteur du CLCF1/CLF .....	47
3.6.3. Activités biologiques du CLCF1 .....	47
3.6.3.1. La prolifération des cellules B et l'induction de la réponse humorale .....	47
3.6.3.2. Les fonctions neurotrophiques .....	48
3.6.3.3. La glomérulosclérose segmentaire focale ou FSGS .....	48
3.6.3.4. Le rôle du CLCF1 dans la fibrose pulmonaire idiopathique.....	49
3.6.3.5. Le Syndrome CISS et Crisponi.....	49
3.7. Le facteur neurotrophique ciliaire : CNTF .....	50
3.7.1. Identification, profil d'expression et récepteurs du CNTF .....	50
3.7.2. Fonctions biologiques du CNTF .....	51
3.7.2.1. Effets neuroprotecteurs .....	51
3.7.2.2. Effets métaboliques.....	52
4. Les lipoprotéines .....	53
4.1. Vue globale .....	53
4.2. Classification des lipoprotéines .....	54
4.2.1. Les chylomicrons (CM) .....	54
4.2.2. Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL).....	54
4.2.3. Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) .....	55
4.2.4. Les lipoprotéines de faible densité (LDL) .....	55
4.2.5. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) .....	56
4.3. Les récepteurs aux lipoprotéines.....	56
4.3.1. La famille des récepteurs des LDL (LDLR).....	56
4.3.2. Le récepteur "scavenger" des HDL : SR-B1.....	58
5. Les apolipoprotéines .....	60
5.1. Vue générale .....	60
5.2. L'apolipoprotéine E (apoE) .....	61
5.2.1. Identification et profil d'expression.....	61
5.2.2. Structure de l'apoE .....	61

5.2.3. Polymorphisme de l'apoE .....	62
5.2.4. Les récepteurs de l'apoE.....	64
5.2.5. Les différentes fonctions de l'apoE.....	64
5.2.5.1. Le transport du cholestérol et l'athérosclérose.....	64
5.2.5.2. Les propriétés neurologiques de l'apoE .....	65
5.2.5.3. L'apoE et la pathologie du FSGS .....	66
5.2.5.4. Les réponses immunoregulateures.....	66
5.2.5.5. La liaison de l'apoE avec les cytokines : exemple du complexe CNTF/ApoE	68
Chapitre II : Objectifs et hypothèses de travail.....	70
Chapitre III : Article 1.....	72
Chapitre IV : Article 2 .....	106
Chapitre V : Discussion .....	142
Chapitre VI : Conclusion .....	157
Chapitre VII : Résultats supplémentaires .....	158
Bibliographie.....	170

## Liste des figures

Figure 1. <b>Différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules T auxiliaires (Th)</b> .....	5
Figure 2. <b>Structure de la famille des cytokines classe I</b> .....	7
Figure 3. <b>Organisation des récepteurs hématopoïétiques classe I</b> .....	10
Figure 4. <b>Activation et régulation de la voie JAK/STAT par les cytokines</b> .....	12
Figure 5. <b>Activation de la voie MAPK et PI3K par les cytokines</b> .....	14
Figure 6. <b>Composition de certaines cytokines de la famille IL-6/IL-12 et leurs récepteurs</b> .....	16
Figure 7. <b>Localisation des sites d'interactions potentiels d'une cytokine de la famille IL-6 avec son récepteur</b> .....	17
Figure 8. <b>Sites d'interaction des cytokines avec leurs récepteurs, exemple de la famille IL- 6/IL-12</b> .....	18
Figure 9. <b>Signalisation classique et trans-signalisation de l'IL-6</b> .....	20
Figure 10. <b>sgp130 inhibe spécifiquement la trans-signalisation de l'IL-6</b> .....	22
Figure 11. <b>Le mécanisme d'inhibition de la signalisation de l'IL-6 par les anticorps 25F10 et 2B10</b> .....	23
Figure 12. <b>Représentation schématique des différents rôles de l'IL-6</b> .....	29
Figure 13. <b>Schéma représentatif de différents anticorps ciblant l'IL-6 dans les essais précliniques et cliniques</b> .....	31
Figure 14. <b>Représentation schématique de différents rôles de l'IL-27</b> .....	40
Figure 15. <b>Représentation schématique des différents récepteurs de l'IL-35</b> .....	44
Figure 16. <b>Représentation schématique du rôle anti-inflammatoire de l'IL-35</b> .....	45
Figure 17. <b>Activation du signal par CNTF</b> .....	51
Figure 18. <b>La composition et la taille de différentes lipoprotéines</b> .....	53
Figure 19. <b>Structure des récepteurs des LDL</b> .....	57
Figure 20. <b>Structure de SR-B1, récepteur des HDL</b> .....	59
Figure 21. <b>Structure et polymorphisme de l'apoE</b> .....	63
Figure 22. <b>EBI3 induit l'activation de la voie STAT1 en absence de l'IL-6 sur les cellules TCD4<sup>+</sup></b> .....	164

Figure 23. <b>EBI3</b> induit l'activation de la voie STAT1 ( <i>A</i> ) et STAT3 ( <i>B</i> ) sur les cellules TCD4 <sup>+</sup> des souris IL-27R déficientes.....	166
Figure 24. <b>EBI3</b> induit la différenciation des cellules Th1.....	167
Figure 25. <b>EBI3</b> inhibe la production du GM-CSF par les cellules T CD4 <sup>+</sup> .....	168
Figure 26. Co-élution du CLCF1 avec les lipoprotéines VLDL et LDL .....	169

## Liste des abréviations

**ADNc** : ADN complémentaire; **ADAM** : *a disintegrin and metalloproteinase* ; **APC** : cellules présentatrices d'antigène; **Apo** : apolipoprotéine; **ApoER** : récepteur d'apoE; **APP** : protéine précurseur de l'amyloïde; **BSA** : albumine de sérum bovin; **BSF-2** : facteur stimulateur des cellules B; **CBD** : *cytokine binding domain*; **CHR** : *cytokine homology region*. **CIA** : *collagen induced arthritis*; **CISS** : *cold induced sweating syndrome*; **CLCF1** : *cardiotrophin-like cytokine factor 1*; **CLF** : *cytokine-like factor 1*; **CM** : chylomicron; **CNTF** : *ciliary neurotrophic factor*; **CNTFR** : récepteur du CNTF; **CT-1** : cardiotrophin-1; **DC** : cellules dendritiques; **DMA** : dégénérescence maculaire liée à l'âge; **EAE** : encéphalomyélite auto-immune expérimentale; **EAU** : uvéorétinite auto-immune expérimentale; **EBI3** : *Epstein-Barr virus Induced gene 3*; **EBV** : *Epstein-Barr Virus*; **EGF** : *endothelial growth factor*; **ERK** : *extracellular signal regulated kinases*; **FC** : fragment constant; **FnIII** : fibronectine de type III; **FoxP3** : *forkhead box P3c*; **FP** : protéine de Fusion; **FSGS** : *focal segmental glomerulosclerosis*; **Glut4** : *glucose transporter type 4*; **GM-CSF** : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; **HDL** : *high density lipoprotein*; **HDLR** : récepteur des HDL; **HRP** : *Horseradish peroxidase*; **HUVEC** : *human umbilical vein endothelial cells*; **IDL** : *intermediate density lipoproteins*; **Ig** : immunoglobuline ; **IL** : interleukine ; **INF** : interféron ; **IPF** : fibrose pulmonaire idiopathique; **IRIS-1** : *insulin receptor substrate 1*; **iTreg** : cellules T régulatrices induites; **Jak** : *janus kinase*; **kDa** : kilo dalton ; **LDL** : *low density lipoprotein*; **LDLR** : récepteur des LDL; **LIF** : *leukaemia inhibitory factor*; **LIFR** : récepteur du LIF; **LPS** : lipopolysaccharide; **LRP** : *LDL receptor related protein*; **LT-CSH** : *long term hematopoietic stem cells*; **MAPK** : *mitogen-activated-protein kinase*; **MHCII** : complexe majeur d'histocompatibilité de type II; **NK** : *natural killer*; **OSM** : oncostatine M; **PI3K** : phosphatidylinositol 3-kinase ; **PIAS** : *protein inhibitor of activated STAT*; **PMA** : phorbol myristate acetate; **RA** : arthrite rhumatoïde; **RANKL** : *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*; **RAP** : *Ras-related protein*; **ROR $\gamma$ t** : *RAR-related orphan receptor gamma*; **sCNTFR** : récepteur soluble du CNTF; **sgp130** : gp130 soluble; **SHP2** : *SH2-domain-containing tyrosine phosphatase*; **sIL-6 $\alpha$**  : chaîne  $\alpha$  soluble du récepteur de l'IL-6; **SLA** : sclérose latérale amyotrophique; **SNC** : système nerveux central; **SOCS** : *suppressor of cytokine signalling*; **SPR** : *surface plasmon resonance*; **STAT** : *signal transducer and activator of transcription*;

**SR-B1** : *scavenger receptor class B member 1*; **T-bet** : *T-box expressed in T cells*; **Tfh** : *follicular helper T cells*; **TGF- $\beta$**  : *transforming growth factor  $\beta$* ; **TLR** : *Toll-like receptor*; **TNF $\alpha$**  : *tumor necrosis factor  $\alpha$* ; **Tr1** : *cellules T régulatrices de type 1*; **Treg** : *cellules T régulatrices*; **UCP-1** : *uncoupling Protein 1*; **VLDL** : *very low density lipoprotein*; **VLDLR** : *récepteur des VLDL*.

*A mes parents, mon frère*

## Remerciements

*Tout d'abord j'adresse mes profonds et sincères remerciements à mon directeur de recherche le Dr Jean-François Gauchat de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Vous avez su me guider tout au long de cette aventure, merci pour le soutien, les conseils, la patience et la disponibilité dont vous avez fait preuve. Votre sourire permanent m'a poussé à gagner mes défis et sans votre aide constante, mon expérience d'étudiante graduée n'aurait pas été enrichissante. Vous êtes bien plus qu'un directeur de recherche pour moi!*

*Je suis reconnaissante à tous les membres du jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail et d'avoir contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de cette thèse. Je pense ici à la Dre Audrey Claing, qui de plus m'a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse, Dr Pierre Haddad, Dr Mohammed Benderdour et Dr Subburaj Ilangumaran.*

*Mes remerciements vont de même à tous les membres du laboratoire qui ont contribué de proche ou de loin à l'accomplissement de cette thèse.*

*Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du département de pharmacologie, et j'en remercie ici tous les membres et les collègues du département pour les précieux conseils et les discussions constructives.*

*Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous mes amis, je vous remercie pour votre soutien et les sorties amusantes!*

*À ma famille qui a cru en moi et m'a soutenue pour aller toujours plus loin, vous êtes ma force et mon support, je vous aime!*



# Chapitre I : Revue de littérature

## 1. Le système immunitaire

### 1.1. Aperçu général

Le terme immunité s'adressait initialement à la résistance des individus vis-à-vis des infections microbiennes. Cette définition s'est élargie aujourd'hui à l'ensemble des réactions moléculaires et cellulaires qui contribuent au maintien de l'intégrité de l'organisme et l'élimination de ses propres constituants altérés, des substances étrangères ou des agents infectieux auxquels il est exposé.

La reconnaissance et l'élimination du pathogène sans engendrer des dommages aux cellules hôtes est la principale caractéristique du système immunitaire. Des mécanismes immunologiques dirigés contre des substances non directement toxiques ou pathogènes par elle-même comme certains composés alimentaires peuvent entraîner des réactions pathologiques d'hypersensibilité ou allergie (2). Des recherches effectuées sur les transfusions sanguines et les greffes ont montré la présence des mécanismes non essentiels pour la défense anti-infectieuse qui pourrait aussi entraîner la destruction des cellules ou organes d'autres personnes et être responsable des rejets de transplantations (3).

Une des clés du bon fonctionnement du système immunitaire est la capacité de distinguer entre les constituants normaux de l'organisme (antigène de soi ou auto-antigène) et les agents pathogènes ou altérés de l'organisme (le «non-soi»). L'activation du système immunitaire contre un ou plusieurs antigènes du soi peut déclencher des pathologies auto-immunes comme la sclérose en plaques et le diabète. En absence d'un traitement efficace, les maladies auto-immunes peuvent être fatales (4).

## 1.2. La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les agents infectieux et fait intervenir différentes cellules et protéines permettant la reconnaissance de l'agent infectieux immédiatement. En raison de la diversité morphologique, des mécanismes d'infection et de modes de réplication des pathogènes, le système immunitaire doit avoir une variété des mécanismes de défense.

La réponse cellulaire innée diffère selon la nature de la cellule et la façon par laquelle elle est stimulée. Parmi les cellules impliquées dans la défense innée, on compte les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Ces cellules se caractérisent par la présence des différents récepteurs permettant la reconnaissance du pathogène (ex. les récepteurs de type toll et les récepteurs scavenger) à travers une variété des produits exprimés par de nombreux microbes (ex. ARN double brin et LPS). Les macrophages dérivent de la moelle osseuse et sont présents dans la majorité des tissus. Ils assurent la phagocytose des particules larges, des cellules mortes et des débris cellulaires. Les neutrophiles, eux, sont capables de phagocyter les petits organismes comme les bactéries et les virus. Les cellules dendritiques sont spécialisées dans la capture, le transport, et la présentation des antigènes aux lymphocytes T (4).

La réponse immunitaire peut se faire par des mécanismes autre que la phagocytose. Par exemple, les cellules NK peuvent produire des substances chimiques qui détruisent les cellules cancéreuses en plus des cytokines qui stimulent et orientent la réponse des lymphocytes B et T. Les cellules innées lymphoïdes (ILC) forment un autre groupe des cellules effectrices de la réponse innée dont la diversité fonctionnelle est proche de celle des cellules T effectrices (Th) de la réponse adaptative. On distingue trois principaux groupes d'ILC, premièrement, les ILC de type 1 qui secrètent de l'INF- $\gamma$  induisant la surveillance tumorale et l'inflammation comme les cellules Th1, deuxièmement, les ILC de type 2 qui produisent des cytokines caractéristiques des cellules Th2, elles interviennent dans la réponse innée contre les parasites intestinaux et l'exacerbation de réactions inflammatoires et allergiques des voies respiratoires, et dernièrement, les ILC de type 3 qui se caractérisent par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$  au même titre que les cellules Th17. Les ILC3 sont présentes dès le stade foetal, elles sont

indispensables à la formation des ganglions périphériques et des tissus lymphoïdes associés à l'intestin. Après la naissance, elles contribuent à la protection de la muqueuse contre les entérobactéries pathogènes et au maintien de la flore commensale sous contrôle (5).

### **1.3. La réponse immunitaire adaptative**

La réponse immunitaire adaptative fait intervenir des cellules spécialisées appelées lymphocytes. Il existe deux classes des lymphocytes: les lymphocytes B et T. Les lymphocytes T dérivent du thymus tandis que les lymphocytes B complètent leur maturation dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B différenciés en plasmocytes produisent une variété d'anticorps spécifiques au pathogène permettant ainsi sa destruction. C'est une immunité à médiation humorale. Par ailleurs, les lymphocytes T peuvent détruire directement les particules étrangères induisant une immunité à médiation cellulaire. On distingue entre les cellules T qui expriment le marqueur CD4 (TCD4<sup>+</sup>) ou CD8 (TCD8<sup>+</sup>) à la surface (4).

Les lymphocytes TCD8<sup>+</sup> sont des cellules T cytotoxiques qui reconnaissent strictement les complexes entre les peptides et les molécules des CMH de classe I exprimées par toutes les cellules somatiques. Les peptides, présentés par les CMH de classe I sont généralement synthétisés à l'intérieur de la cellule. Cette procédure est importante pour tuer les virus avant qu'ils ne se répliquent à l'intérieur des cellules. Les cellules TCD4<sup>+</sup> reconnaissent les cellules qui expriment le MHC classe II. Lorsque les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves rencontrent un antigène, elles sont capables de se différencier en cellules auxiliaires Th1, Th2, Th17, ou Tfh identifiables par les cytokines qu'elles produisent (figure 1). Les cellules Th1 activent les macrophages et les cellules TCD8<sup>+</sup> cytotoxiques conduisant à une réponse immunitaire à médiation cellulaire en favorisant la sécrétion de l'INF- $\gamma$ . Les cellules Th2 soutiennent la différenciation des lymphocytes B pour la production d'anticorps et favorisent aussi les réactions allergiques par activation d'anticorps IgE dirigé contre des substances non nécessairement toxiques. Les cellules Tfh sont localisées dans le centre germinatif (site majeur de la différenciation plasmocytaire) et participent activement aux mécanismes régulant le développement et la maturation des lymphocytes B en plasmocytes, notamment grâce à la sécrétion d'interleukine 21 (IL-21). Les cellules Th17, quant à eux, produisent l'IL-17, l'IL-22 et l'IL-21. Ces cellules

sont importantes pour le contrôle des infections bactériennes extracellulaires et fongiques et jouent un rôle dans le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée comme les polynucléaires neutrophiles. Les lymphocytes Th17 peuvent aussi être impliqués dans plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires comme la sclérose en plaques, les maladies inflammatoires de l'intestin et la polyarthrite rhumatoïde. Généralement, la réponse immunitaire est orientée vers le type de réponse requis pour lutter contre un pathogène donné (6).

Chaque sous-population des cellules T auxiliaire (Th) influence d'une façon négative les autres populations. Par exemple, l'INF- $\gamma$  produite par les Th1 inhibe la différenciation des Th2 et Th17, alors que l'IL-4 produite par les Th2 inhibe la prolifération des Th1 et Th17. Un système d'autorégulation contribue à prévenir la prolifération des cellules T auto-immunes susceptibles de détruire les cellules de soi et diminuer l'intensité de la réponse immunitaire. Cette régulation est médiée par les cellules T régulatrices ou Treg (figure 1). On distingue les cellules Treg naturelles et les Treg induites. Les cellules Treg naturelles se différencient dans le thymus et migrent afin de performer l'homéostasie immune, elles expriment des marqueurs spécifiques à la surface à savoir CD25 et le facteur de transcription Foxp3. D'autre part, les cellules Treg induites sont générées en périphérie où elles acquièrent l'expression du marqueur CD25, elles ne sont activées qu'en présence d'une condition inflammatoire ou une maladie auto-immune (7).

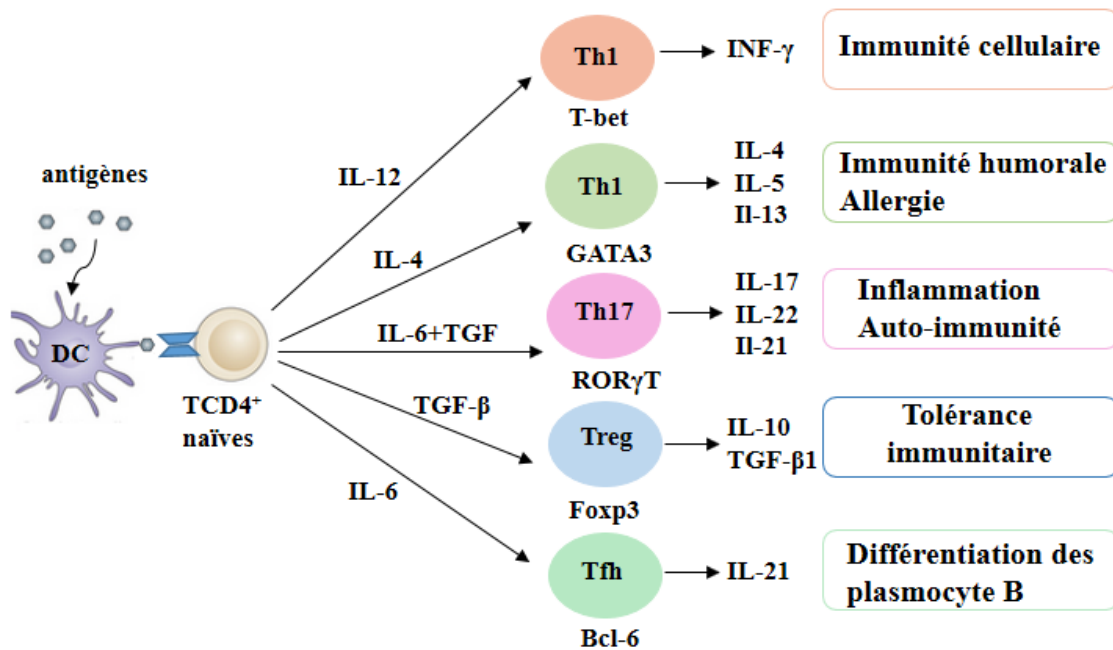


Figure 1. **Différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules T auxiliaires (Th)**

L'activation des cellules TCD4<sup>+</sup> naïves en présence d'un antigène induit leurs proliférations et différenciations en plusieurs sous-types de lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2, Th17, Treg et Tfh). La nature des cytokines présentes dans le milieu extracellulaire contrôle l'expression de différents facteurs de transcription qui caractérisent chaque sous-type de cellules (par exemple, l'IL-12 induit l'expression du facteur de transcription T-bet qui marque la sous-population Th1). Chaque sous-type de cellules secrètent des cytokines spécifiques impliquées dans différentes fonctions biologiques (par exemple, les cellules Th1 induisent la production d'INF- $\gamma$  impliquée dans la réponse cellulaire cytotoxique des cellules TCD8<sup>+</sup>).

## 2. Les cytokines

### 2.1. Généralité

Les cytokines représentent un groupe diversifié de glycoprotéines de faible poids moléculaire (8 à 70 kDa), comparables aux hormones et aux facteurs de croissance, qui peuvent être membranaires ou sécrétées par plusieurs types cellulaires du système immunitaire en réponse à une stimulation. Les cytokines agissent comme des médiateurs et régulateurs des processus immunitaires. Toutefois, de nombreuses cytokines peuvent avoir des effets hors du système immunitaire comme les cytokines de l'hématopoïèse. Les cytokines permettent une communication entre différentes cellules et régulent ainsi une variété de fonctions biologiques: prolifération, différenciation, activation, survie, ou mort cellulaire (8).

Les cytokines peuvent être classées selon l'ordre de leur découverte (IL-1, IL-35), leur activité biologique (facteur de nécrose tumorale : TNF, facteur de croissance des granulocytes : GCSF, fonction chimiotactique : chimiokines), leurs cellules d'origine (cytokines qui dérivent des monocytes : monokines, des lymphocytes : lymphokines ou interleukines, ou bien des cellules adipeuses : adipokines). Les superfamilles des cytokines présentent une homologie structurale et peuvent partager certains récepteurs, mais elles n'ont pas forcément la même activité biologique (9).

Les cytokines se caractérisent par une forte affinité envers leurs récepteurs; des concentrations de l'ordre du picomolaire des cytokines peuvent induire une réponse biologique. Comme pour les hormones, les cytokines peuvent agir sur un grand nombre de cellules avoisinantes (paracrine), sur les cellules productrices elles-mêmes (autocrine), ou également agir à l'intérieur des cellules productrices sans être sécrétées (intracrine). Le réseau des cytokines est aussi défini par son action simultanée qui peut aboutir à un effet additif, synergique ou antagoniste (4).

## 2.2. La famille des cytokines hématopoïétiques classe I

Des études de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire permettent de déterminer la structure secondaire des cytokines classe I composée d'un faisceau de quatre hélices  $\alpha$  antiparallèles deux à deux connectées par des boucles non structurées qui ont une forme longue pour les hélices antiparallèles A et B, et une forme courte pour les hélices B et C (figure 2). Contrairement à leurs récepteurs, les cytokines de type I ne présentent pas ou peu d'homologie au niveau de leurs séquences primaires permettant de les réunir au sein d'une même famille (10, 11).

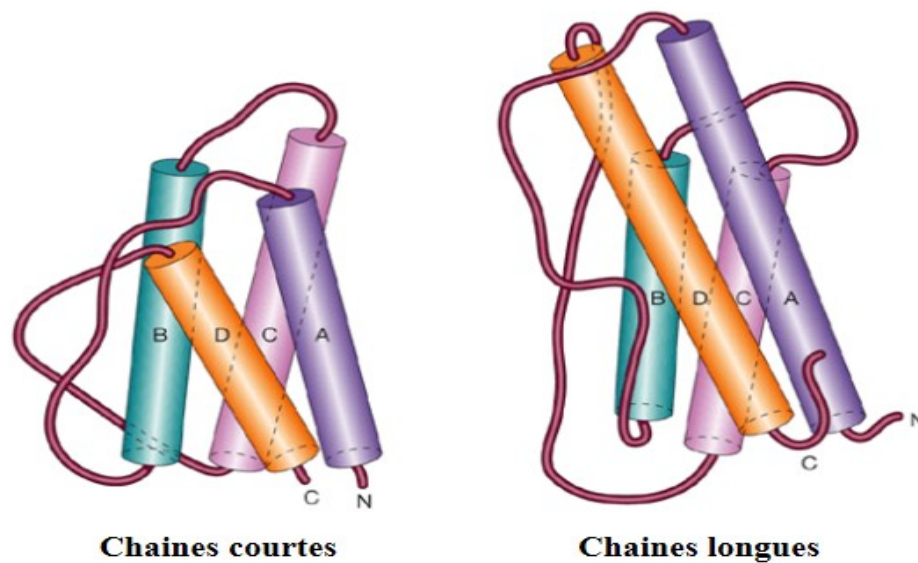


Figure 2. **Structure de la famille des cytokines classe I**

La structure secondaire des cytokines classe I est composée d'un faisceau de quatre hélices  $\alpha$  antiparallèles deux à deux connectées par des boucles non structurées qui ont une forme longue pour les hélices A et B, et une forme courte pour les hélices B et C. Ces cytokines sont divisées selon la longueur des hélices  $\alpha$  en chaînes courtes (~15 acides aminés : IL-3, IL-4, IL-5, G-MCSF et INF- $\gamma$ ) et chaînes longues (25 acides aminés : IL-6, LIF, CNTF et IL-10). De plus, les cytokines ayant une chaîne courte se caractérisent par une boucle "AB" sous la boucle "CD" contrairement aux cytokines ayant une chaîne longue (11).

## 2.3. Les récepteurs des cytokines classe I

Parmi les familles des récepteurs aux cytokines, on distingue entre les récepteurs des cytokines hématopoïétiques classe I (figure 3), les récepteurs des cytokines des familles d'interférons (IFNs) et de l'IL-10 (classe II), les récepteurs de la superfamille des TNF (classe III), les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines comme l'IL-1, les récepteurs sérine/thréonine kinases de la famille du TGF- $\beta$ , les récepteurs à sept domaines transmembranaires des chimiokines et la famille des récepteurs de l'IL-17.

Les récepteurs des cytokines classe I sont aussi appelés les récepteurs d'hématopoïétine, ils constituent le groupe le plus large des récepteurs de cytokines. Ce sont des récepteurs membranaires qui présentent une orientation N-terminal extracellulaire et C-terminal intracellulaire. La partie extracellulaire se caractérise par la présence d'une ou plusieurs régions d'homologie de liaison des cytokines (motif CHR) (12). Le motif CHR est constitué par deux domaines de fibronectines de type III (FNIII) impliqués dans la liaison de la cytokine. Le premier domaine situé sur la partie N-terminal contient quatre résidus (deux paires) de cystéines conservées engagées dans des ponts disulfures indispensables à la fonctionnalité du CHR. Le second domaine comprend un motif Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) conservé proche du domaine transmembranaire. Le rôle de ces acides aminés serait de maintenir la structure tertiaire de la protéine, et ils ne sont pas impliqués dans l'interaction avec les cytokines (13). En plus des domaines FNIII, plusieurs récepteurs de type 1 requièrent des domaines supplémentaires de type immunoglobuline (Ig) et/ou des répétitions de type fibronectines.

Le domaine cytoplasmique des récepteurs hématopoïétiques contient des motifs conservés qui participent à la transduction du signal. Le motif (Box1) contient une région riche en proline assure la liaison des tyrosines kinases de la famille des JAKs tandis que le motif (Box2) augmente l'affinité des JAKs au niveau des chaînes transductrices. Les récepteurs aux cytokines type I ont une structure souvent complexe et comportent une, deux, voire trois chaînes polypeptidiques différentes codées par des gènes distincts.



En raison de la redondance des fonctions entre différentes cytokines, due au partage de différentes chaînes transductrices du signal et aussi la nature des récepteurs qui peuvent être dimérique ou trimérique, quatre principaux groupes de cytokines hématopoïétiques peuvent être définis :

- Le groupe des cytokines ayant un récepteur homodimérique : dans ce cas, la chaîne réceptrice joue le rôle à la fois de liaison des cytokines et transduction du signal. Parmi les cytokines de ce groupe, on compte le G-CSF et la leptine.

- Le groupe des cytokines ayant un récepteur hétérodimérique en utilisant la chaîne  $\beta_c$  en plus de la chaîne  $\alpha$  : IL-3 et GM-CSF.

- Le groupe des cytokines ayant un récepteur hétérodimérique ou hétérotrimérique utilisant la chaîne  $\gamma_c$  de plus que la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$  : IL-2, IL-15, IL-21, IL-7, etc.

- Les cytokines de la famille IL-6/IL-12 ayant un récepteur multimérique. La famille IL-6 partage la chaîne transductrice du signal gp130. Certaines cytokines appartenant à la famille IL-12 comme IL-12, IL-23, IL-27, IL-35, et IL-39 ont des structures comparables à celle d'un complexe cytokine/récepteur soluble. La structure et le mode d'utilisation des récepteurs spécifiques solubles permettent de rapprocher la famille de l'IL-6 de celle de l'IL-12.

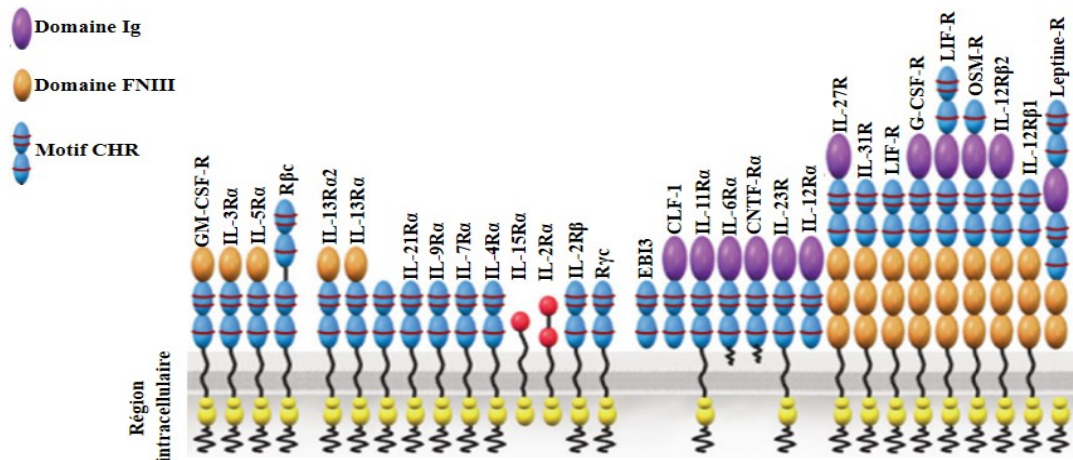


Figure 3. **Organisation des récepteurs hématopoïétiques classe I**

La région extracellulaire des récepteurs hématopoïétiques classe I comporte un ou deux motifs CHR. Le motif CHR est constitué par deux domaines de FNIII. Le premier domaine situé sur la partie N-terminal contient quatre résidus de cystéines marqués par deux traits tandis que le second domaine comporte un motif WSXWS marqué par un seul trait. Certains récepteurs requièrent des domaines supplémentaires de type Ig ou de FNIII. D'autres récepteurs contiennent un ou plusieurs domaines sushi. La région intracellulaire des récepteurs hématopoïétiques classe I comporte des motifs qui permettent l'interaction avec les protéines impliquées dans l'activation des voies de signalisation.

## 2.4. La voie de signalisation des cytokines hématopoïétiques classe I

### 2.4.1. La Voie JAK/STAT

Les récepteurs aux cytokines type I n'ont pas une activité enzymatique intrinsèque. Le domaine intracellulaire de ces récepteurs est associé d'une manière constitutive avec une tyrosine kinase appartenant à la famille des Janus kinases (JAK). L'activation des JAKs a lieu lors de la liaison du ligand à son récepteur. Le rapprochement des chaînes du récepteur provoque l'autophosphorylation et/ou la transphosphorylation des JAKs associées sur des résidus tyrosines. Ces résidus sont ensuite reconnus par des protéines contenant des domaines SH2 tels

que les STATs. Les STATs possèdent un domaine d'activation de la transcription et migrent vers le noyau afin de se lier aux séquences d'ADN et stimuler la transcription des gènes cibles situés dans la région promotrice (figure 4). Les protéines STATs sont au nombre de sept : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Chaque membre de la famille des protéines STATs répond à des cytokines définies (14).

#### **2.4.2. La régulation négative de la voie JAK/STAT**

Une régulation défectueuse de la signalisation des cytokines peut induire l'inflammation, l'allergie, le développement des maladies auto-immunes ou le cancer. La famille des protéines intracellulaires CIS/SOCS participe à la régulation négative de la voie JAK/STAT utilisée par la majorité des cytokines (15, 16). Il existe huit protéines appartenant à cette famille, CIS et SOCS1-SOCS7. Chaque membre présente un domaine SH2 central, un domaine N-terminal avec une longueur et séquence d'acides aminés variables et un domaine C-terminal. Le domaine SH2 détermine la cible de chaque SOCS et CIS; il interagit avec les résidus tyrosines phosphorylés des protéines JAKs ce qui entraîne leur inactivation (16, 17). Les SOCS1 et SOCS3 peuvent également inactiver les cytokines suite à une interaction avec une région kinase inhibitrice de signal (KIR) située sur les protéines JAKs (17). Comme les récepteurs qui lient les protéines SOCS3 activent majoritairement les STAT3, SOCS3 est considérée comme un inhibiteur spécifique pour STAT3. Cependant, SOCS3 inhibe également la voie STAT4 activée par IL-12 (18).

L'activation de la signalisation JAK/STAT est aussi contrôlée par des protéines tyrosines phosphatases (PTP) qui inactivent les protéines JAKs et STATs phosphorylées. Les tyrosines phosphatases contiennent un domaine catalytique PTPase qui permet de procéder à la déphosphorylation de leurs substrats (14). En outre, l'activité transcriptionnelle des STATs peut être aussi inhibée par des protéines inhibitrices des STATs activées appelées «PIAS». Les PIAS interagissent avec la forme homodimère des STATs induisant l'inhibition de la transcription des gènes cibles en empêchant la liaison des STATs avec l'ADN ou en recrutant d'autres molécules corépresseurs (14).

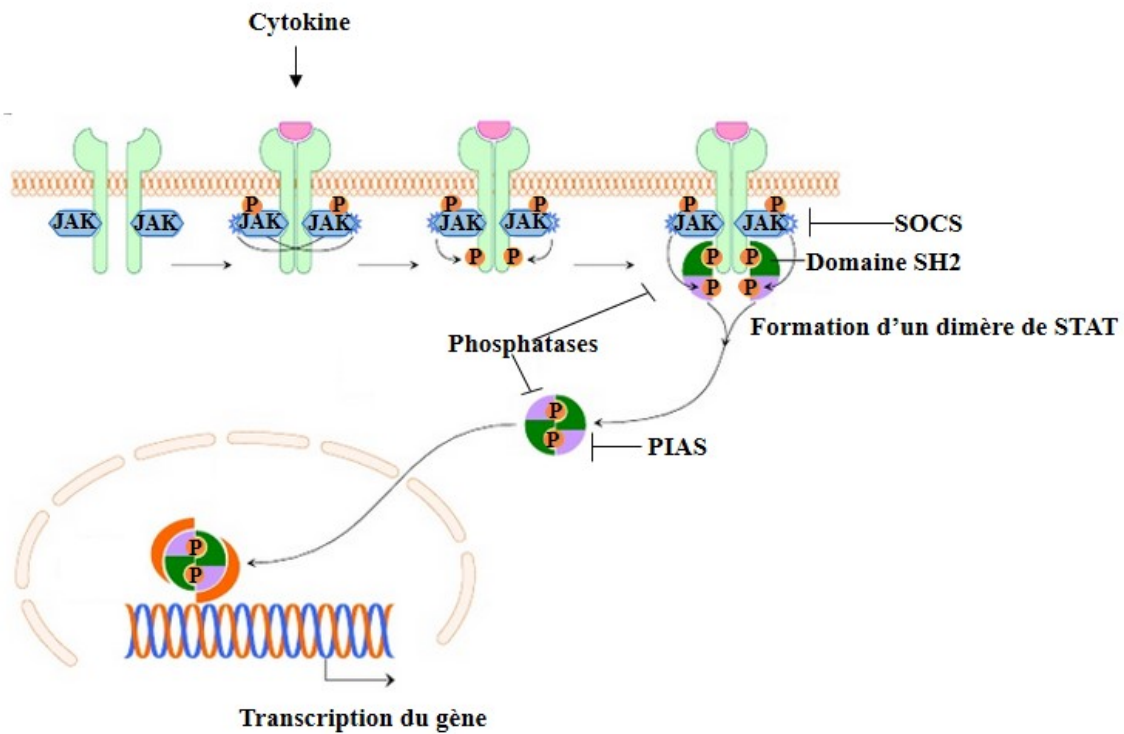


Figure 4. **Activation et régulation de la voie JAK/STAT par les cytokines**

La dimérisation des récepteurs suite à la liaison des cytokines provoque la phosphorylation de la tyrosine kinase JAK associée d'une manière constitutive au domaine intracellulaire. L'activation de JAK induit par la suite la phosphorylation des résidus tyrosines reconnues par des protéines contenant des domaines SH2 comme les STATs. Les STATs possèdent un domaine d'activation de la transcription et migrent vers le noyau afin de se lier aux séquences d'ADN et stimuler la transcription des gènes ciblés. L'activation de la voie JAK/STAT est contrôlée par des protéines qui interagissent avec les tyrosines phosphorylées des protéines JAK (SOCS et phosphatases) entraînant leur déphosphorylation ou dégradation ou des protéines inhibitrices des STAT (PIAS).

### 2.4.3. Les voies MAPK et PI3K

Les MAP Kinases appartenant à la famille des serines/thréonines kinases constituent les composants majeurs de la signalisation inflammatoire à partir de la surface de la cellule jusqu'au noyau. L'activation des MAP kinases requiert une cascade d'enzymes pour phosphoryler leurs résidus thréonine et tyrosine. ERK est la première MAPK identifiée, elle constitue le dernier maillon de cette cascade qui se caractérise par l'existence de points d'embranchement au niveau de Raf ou de MEK (figure 5). ERK constitue le médiateur vital de plusieurs fonctions cellulaires incluant la prolifération, la croissance et la survie. Deux isoformes d'ERK sont exprimées: ERK1 et ERK2 qui sont habituellement co-exprimées et fonctionnellement équivalentes. La voie ERK1/2 est responsable de plusieurs processus pro-inflammatoires. Les souris déficientes en ERK1 montrent une maturation défective des thymocytes et une réduction de l'expression des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des récepteurs des cellules T (19). ERK semble donc être nécessaire pour l'activation des cellules T. D'autres kinases comme la p38 Kinase et JNK peuvent aussi être activées en réponse à certaines cytokines. La durée d'activation des MAP Kinase est contrôlée par la présence de phosphatases. La voie MAPK est en général associée à la prolifération cellulaire et à la prévention de l'apoptose (20).

Plusieurs récepteurs aux cytokines peuvent recruter des intermédiaires de signalisation autres que les JAK/STATs et MAPK. L'autre principale voie de signalisation activée par les cytokines est la voie de la PI3K (figure 5) qui est également importante pour la stimulation de la prolifération cellulaire par des cytokines comme l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et le GM-CSF (21, 22).

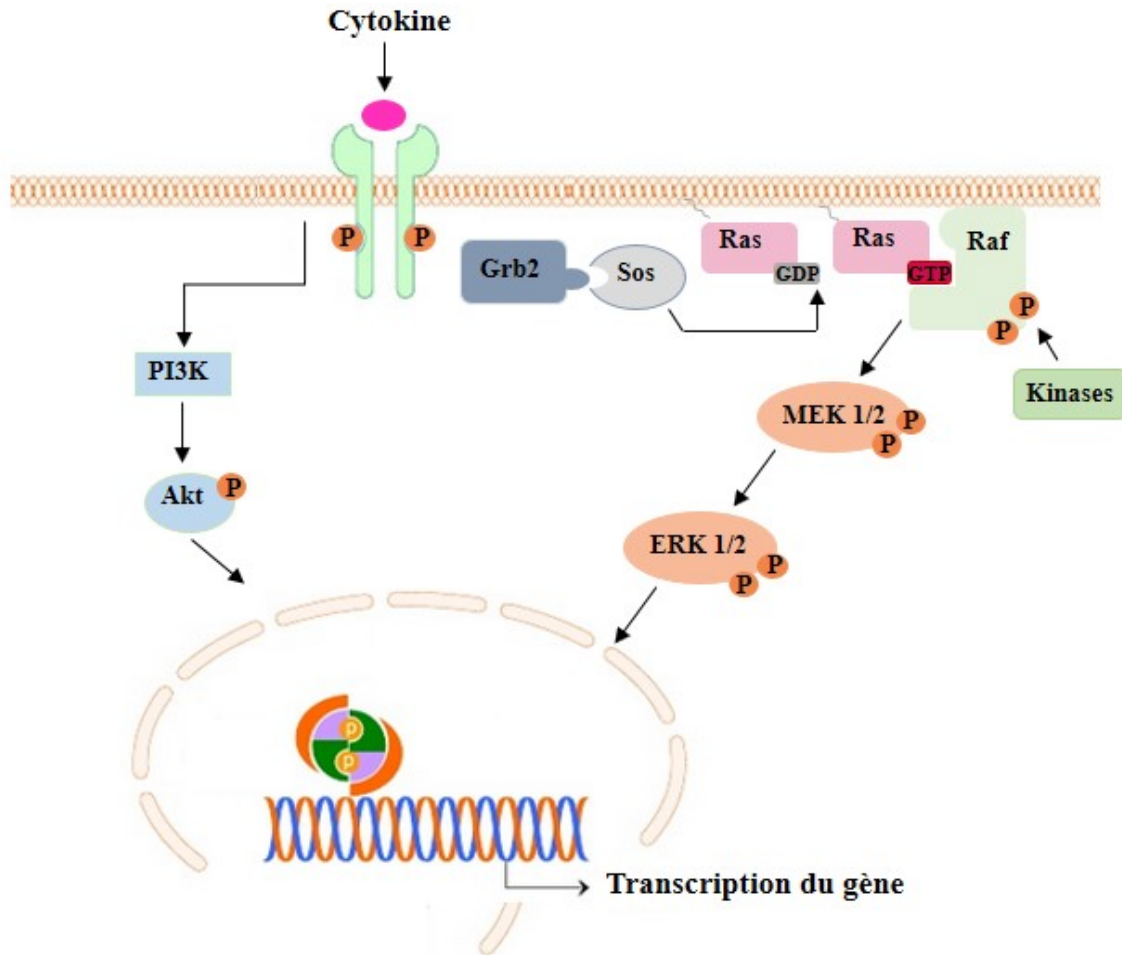


Figure 5. **Activation de la voie MAPK et PI3K par les cytokines**

La PI3K participe à l'activation de deux voies de signalisation soit la voie Akt ou MAPK. La PI3K recrute la sérine/thréonine kinase Akt à proximité de la membrane plasmique, où elle est alors phosphorylée et activée. La voie MAPK commence par la liaison du Grb2 sur les résidus phosphorylés de la partie intracellulaire du récepteur par le domaine SH2. Grb2 est une molécule adaptatrice qui va lier la protéine SOS sur le récepteur induisant ainsi son activation. L'activation du SOS induit l'échange entre la forme Ras-GDP vers la forme active Ras-GTP. Ras-GTP va ensuite provoquer la phosphorylation du Raf qui va activer la transduction d'une cascade de signal qui inclut MEK et ERK induisant ainsi la transcription du gène ciblé.

## 3. La famille IL-6/IL-12 des cytokines

### 3.1. Aperçu général

Les cytokines de la famille IL-6/IL-12 (figure 6) font partie de la famille des cytokines classe I. La famille IL-12 est constituée de sous-unités hétérodimériques contrairement aux cytokines de la famille IL-6 qui sont secrétées sous forme monomérique. Les chaînes  $\alpha$  des cytokines de la famille IL-12 (p19, p28, p35) sont homologues aux cytokines de la famille IL-6 (IL-6, IL-11, LIF, CNTF, NP, CT-1, CLCF1, OSM). En effet, ces chaînes  $\alpha$  peuvent s'apparier avec deux possibles sous-unités  $\beta$  (p40 et EBI3), qui ressemble étroitement au domaine extracellulaire des récepteurs membranaires type I des cytokines de la famille IL-6 (IL-6R $\alpha$ , IL-11R $\alpha$  et CNTFR $\alpha$ ) (23). Les sous-unités  $\beta$  de la famille IL-12 n'ont pas de domaine transmembranaire et sont donc secrétées sous forme d' $\alpha/\beta$  hétéromères. Actuellement, la famille IL-12 est composée de quatre cytokines avec l'appariement suivant des sous-unités  $\alpha/\beta$  : IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27 (p28/EBI3), IL-35 (p35/EBI3) et la nouvelle cytokine IL-39 (p19/EBI3) (24, 25). La famille de l'IL-6/IL-12 active un récepteur des cytokines de type I et induit la phosphorylation de JAK/STAT ainsi que l'activation des MAPK (ERK) et de la PI3K (26, 27). Malgré la similarité structurale entre les différentes cytokines et récepteurs de la famille IL-6/IL-12, leurs activités biologiques diffèrent selon le type cellulaire et la signalisation induite.

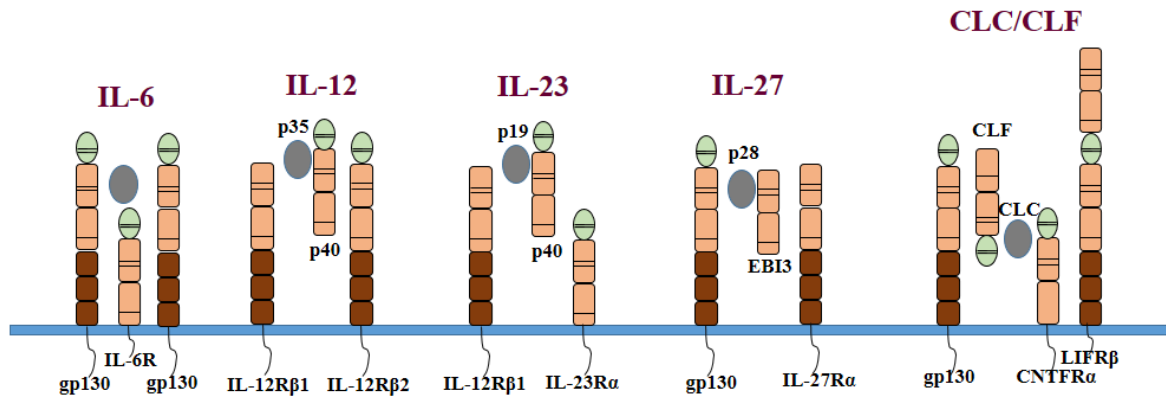
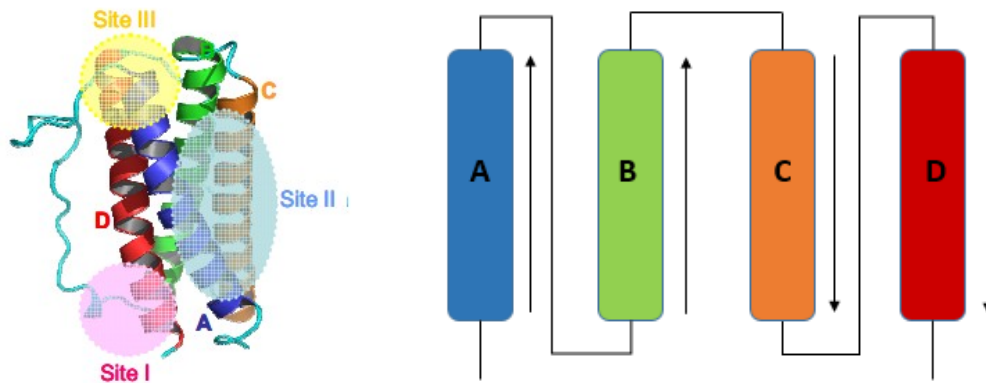


Figure 6. **Composition de certaines cytokines de la famille IL-6/IL-12 et leurs récepteurs** IL-6, IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27(p28/EBI3) et CLCF1/CLF font partie de la famille des cytokines IL-6/IL-12. Ces cytokines induisent le signal à travers des chaînes de récepteurs associées à chaque cytokine (par exemple, l'IL-27 active les deux chaînes gp130 et IL-27Rα alors que le CLCF1/CLF induit la formation d'un récepteur trimérique composé de la chaîne gp130, CNTFRα et LIFRβ).

### 3.2. Sites d'interaction entre les cytokines et les récepteurs de la famille IL-6/IL-12

Des études de cristallographie et de mutagenèse effectuées sur les différents sites d'interactions des hormones de croissance avec leurs récepteurs ont permis de définir deux sites d'interaction d'un ligand avec ses chaînes réceptrices (13, 28). Le premier site (site I) est composé des résidus d'acides aminés de l'hélice D et de la boucle AB. Le second site (site II) est formé de résidus des hélices A et C. Un troisième site a été mis en évidence suite à des études de mutagenèse dirigée sur des cytokines de la famille de l'IL-6. Le site III est localisé à l'extrémité N-terminale de l'hélice D et permet la liaison avec une chaîne β (29) (figure 7).





**Figure 7. Localisation des sites d'interactions potentiels d'une cytokine de la famille IL-6 avec son récepteur**

Les cytokines de la famille de l'IL-6/IL-12, comme toutes celles se liant aux récepteurs des cytokines de type I, sont formées de quatre hélices  $\alpha$  antiparallèles deux à deux indiquées par les flèches. Les sites I, II et III constituent des interfaces de liaison entre la cytokine et son récepteur. Ils sont constitués de résidus de la boucle AB, à l'extrémité de l'hélice D et aux hélices A et C respectivement. Le site III est localisé à l'extrémité N-terminale de l'hélice D.

Les récepteurs des cytokines de la famille IL-6/IL-12 sont constitués de domaines conservés dans leur partie extracellulaire, en particulier, le domaine CBD « domaine de fixation de la cytokine » en plus des domaines de type Ig qui font partie de la structure de quelques cytokines de cette famille (30). Ces deux domaines déterminent les sites d'interaction des cytokines avec leurs récepteurs (figure 8).

Le site I permet la liaison de la chaîne  $\alpha$  définie pour la famille IL-12 (p19, p28, et p35) avec les sous-unités  $\beta$  respectives (p40 et EBI3). Ce site est le même pour l'interaction de la famille IL-6 (IL-6, IL-11, CNTF, CLCF1...) avec les chaînes  $\alpha$  des récepteurs (IL-6R, IL-11R, et CNTFR).

Les domaines de type Ig et CBD définissent les sites d'interaction entre les chaînes réceptrices et les ligands. Le domaine de type Ig est nécessaire pour la liaison avec le site III. Par exemple, pour le récepteur d'IL-12 et d'IL-27, seuls l'IL-12R $\beta$ 2 et le gp130 contiennent un domaine Ig ce qui suggère leur interaction avec le site III laissant le site II pour l'IL-12R $\beta$ 1 et l'IL-27R $\alpha$  respectivement. Toutefois, il arrive que les chaînes de récepteurs d'une cytokine contiennent toutes un domaine Ig, par exemple, l'IL-6 induit le signal à travers un récepteur homodimère composé de deux sous-unités gp130. La cristallisation de l'IL-6 suggère qu'une forme hexamérique composée de 2 IL-6, 2 IL-6R $\alpha$  et 2gp130 est nécessaire pour induire le signal (31). Dans ce modèle, l'IL-6 se lie sur l'IL-6R $\alpha$  à travers le site I. Une chaîne gp130 pourrait interagir avec deux molécules d'IL-6, elle lie le site III de la première molécule à travers le domaine Ig gardant le domaine CBD pour la fixation sur le site II de la deuxième molécule d'IL-6 (31). D'autre part, les récepteurs hétérodimériques du LIF (LIFR- $\beta$ /gp130) contiennent les deux un domaine Ig (32), dans ce cas de figure, le LIFR- $\beta$  se lie sur le site III, pourtant, ceci n'empêche pas l'existence d'un modèle où l'interaction du LIFR- $\beta$  a lieu sur le site II à travers le domaine CBD (33).

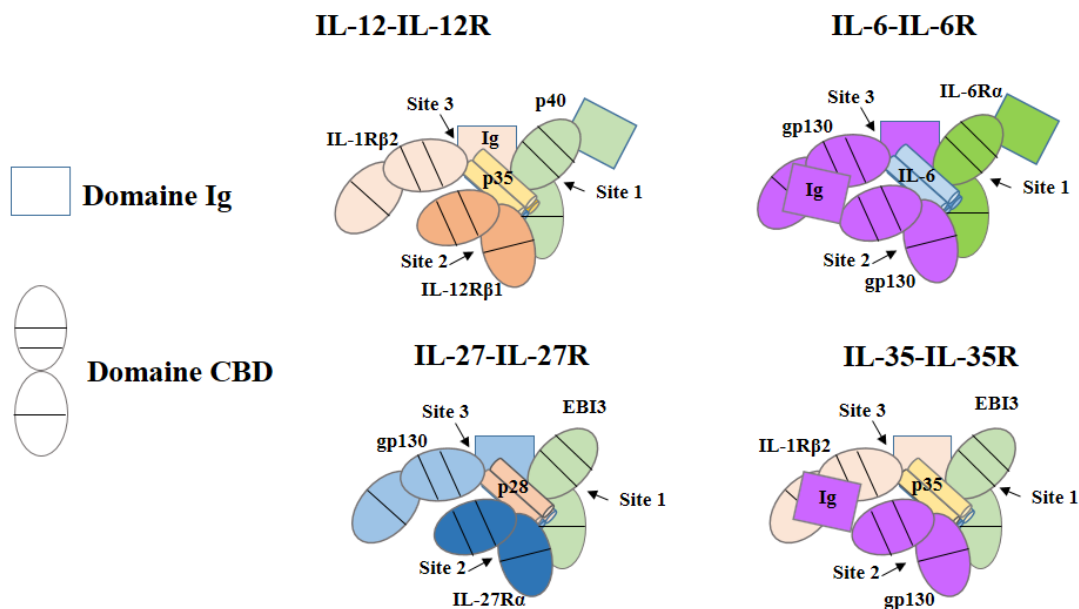


Figure 8. Sites d'interaction des cytokines avec leurs récepteurs, exemple de la famille IL-6/IL-12

Le site I permet l'interaction entre les deux sous-unités  $\alpha$   $\beta$  qui forment les cytokines composites IL-12 (p40/p35), IL-27 (EBI3/p28) et IL-35 (EBI3/p35) ou bien de la cytokine monomérique IL-6 avec la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-6 (IL-6R $\alpha$ ). Les récepteurs contenant le domaine Ig (gp130 et IL-12R $\beta$ 1) sont par la suite impliqués dans l'interaction avec le site 3 de la cytokine à travers ce même domaine laissant le site II pour la liaison avec les autres chaînes de récepteurs à travers le domaine CBD (ex, IL-27R $\alpha$ , IL-12R $\beta$ 1 et gp130).

### **3.3. Interleukine-6**

#### **3.3.1. Identification et profil d'expression**

L'IL-6 appartient à la famille des cytokines hématopoïétiques type I. Elle a été clonée pour la première fois en 1986 comme un facteur stimulateur des cellules B ou BSF-2 (34). Après élimination du peptide signal, l'IL-6 est sécrétée avec une masse moléculaire variant entre 19 et 26 KDa et 2 sites de N-glycosylation. L'IL-6 est sécrétée par différents types cellulaires incluant les monocytes, les cellules T, les cellules B, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les adipocytes et quelques cellules tumorales (35-37).

#### **3.3.2. La signalisation classique de l'IL-6**

Le récepteur de l'IL-6 est composé d'une glycoprotéine transmembranaire de type-1 d'environ 80 kDa appelée (IL-6R $\alpha$ , CD126 ou gp80) qui s'associe à la chaîne gp130. La signalisation classique de l'IL-6 commence par la formation du complexe entre l'IL-6 et l'IL-6R $\alpha$  membranaire qui va ensuite interagir avec la sous-unité gp130 qui subit par la suite une dimérisation. Des études réalisées en utilisant des formes recombinantes des protéines IL-6R $\alpha$  et gp130 ont montré que l'IL-6 peut former un composé hexamérique constitué de 2 IL-6, 2 gp130 et 2 IL-6R $\alpha$ . Cette forme hexamérique existe également au niveau sérique, y compris chez environ 20% des individus sains. La dimérisation du gp130 induit l'activation des cascades de signalisation intracellulaire (38) qui se caractérise par la phosphorylation de résidus tyrosines par les enzymes JAK, le recrutement de facteurs de transcription STAT1, 3 et 5 et l'activation

de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la fonction biologique de l'IL-6. Plusieurs cellules expriment la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-6 (IL-6R $\alpha$ ) et répondent donc à la signalisation classique d'IL-6, notamment, les cellules hématopoïétiques comme les cellules T, les monocytes, les cellules B activées, les macrophages et les neutrophiles (39).

### 3.3.3. La trans-signalisation de l'IL-6

Plusieurs cellules répondent à l'IL-6 sans exprimer la chaîne  $\alpha$  du récepteur (l'IL-6R $\alpha$ ). Ceci est expliqué par l'existence d'une forme soluble d'IL-6R $\alpha$  dépourvue du domaine intracellulaire et formée par le clivage protéolytique de métalloprotéases de la famille ADAM (40). L'induction précoce de l'apoptose des cellules exprimant l'IL-6R $\alpha$  interfère avec l'intégrité de la membrane cytoplasmique et induit une réorientation des phospholipides ce qui facilite l'action des métalloprotéases (41). Le récepteur IL-6R $\alpha$  soluble forme un complexe avec l'IL-6 qui se lie par la suite aux cellules qui expriment la chaîne gp130 induisant une voie d'activation appelée trans-signalisation (figure 9) (42). Étant donné que l'expression de la chaîne gp130 est ubiquitaire, le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  pourrait théoriquement induire une réponse sur de nombreuses cellules. Ce processus semble être régulé naturellement par la présence d'une concentration sanguine élevée d'une forme soluble de la chaîne gp130 inhibitrice de la trans-signalisation (figure 9) (43).

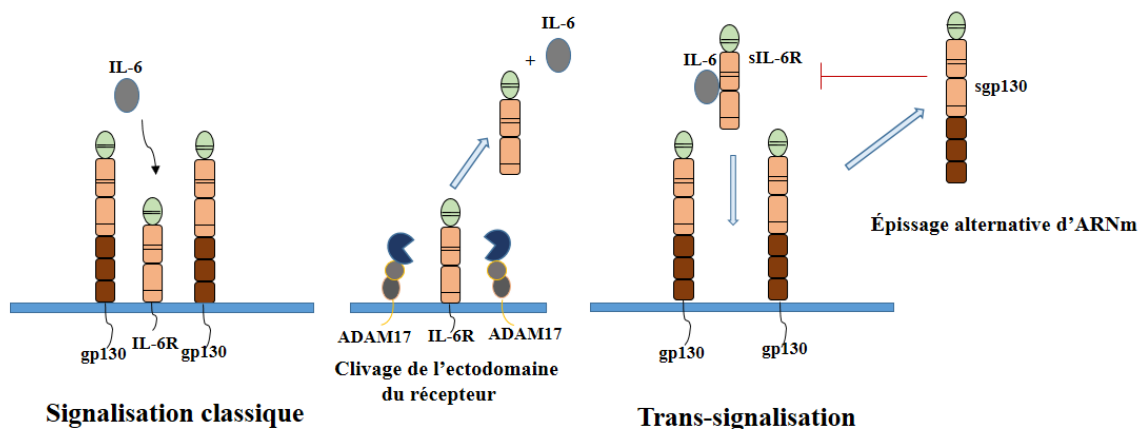


Figure 9. Signalisation classique et trans-signalisation de l'IL-6

La signalisation classique est représentée par la liaison de l'IL-6 avec la chaîne IL-6R $\alpha$  ancrée à la membrane. Le complexe membranaire IL-6/IL-6R $\alpha$  active les cellules exprimant le récepteur membranaire gp130. La présence des métalloprotéases de la famille ADAM induit le clivage protéolytique de la chaîne IL-6R $\alpha$  ce qui en résulte la libération de l'IL-6R $\alpha$  soluble (sIL-6R $\alpha$ ). La trans-signalisation a lieu lorsque le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  se forme, celui-ci pourrait activer les cellules qui expriment seulement le récepteur gp130. Une forme soluble du gp130 issu d'un épissage alternatif pourrait inhiber naturellement le signal de la trans-signalisation.

### **3.3.4. Stratégies d'étude de la signalisation classique et trans-signalisation de l'IL-6**

Plusieurs protéines recombinantes chimériques ont été générées et appliquées dans différentes études à la fois *in vitro* et *in vivo* afin de caractériser les cibles cellulaires de la trans-signalisation de l'IL-6.

La protéine de fusion Hyper-IL-6 dans laquelle l'IL-6R $\alpha$  et l'IL-6 sont liées d'une façon covalente par une protéine flexible (44). L'hyper-IL-6 induit des réponses de type IL-6 seulement sur les cellules qui expriment le récepteur gp130. Parmi les cellules qui répondent à l'IL-6 seulement en présence du sIL-6R $\alpha$  on trouve les cellules souches hématopoïétiques (45), les cellules lisses musculaires (46), les cellules embryonnaires (47), et les cellules endothéliales humaines (48).

La protéine de fusion sgp130Fc qui comprend la partie extracellulaire du gp130 en liaison avec la région Fc de l'IgG1 humain qui permet la dimérisation du gp130. La protéine de fusion sgp130Fc inhibe complètement la trans-signalisation de l'IL-6 et n'a aucun effet sur la signalisation classique (figure 10) (49). Ceci suggère que l'IL-6 et l'IL-6R $\alpha$  seules n'ont aucune affinité mesurable envers le sgp130 et seul le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  pourrait être reconnu par la forme soluble du gp130.

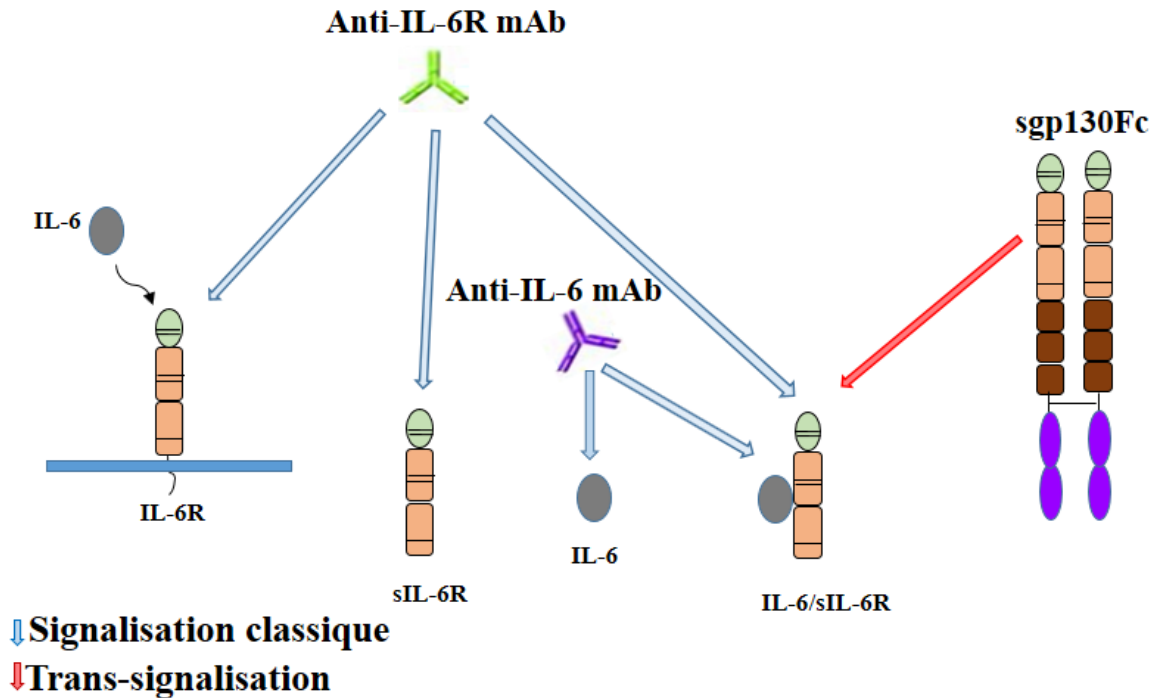


Figure 10. **sgp130 inhibe spécifiquement la trans-signalisation de l'IL-6**

Les deux anticorps monoclonaux anti-IL-6R et anti-IL-6 bloquent à la fois la signalisation classique et la trans-signalisation de l'IL-6. L'anticorps anti-IL-6R inhibe la chaîne IL-6R $\alpha$  qu'elle soit liée à la membrane ou sous une forme soluble. L'inhibition spécifique de la trans-signalisation a lieu en utilisant un dérivé de la forme soluble du gp130 (sgp130Fc).

L'anticorps monoclonal 25F10 a été récemment développé pour inhiber spécifiquement la trans-signalisation de l'IL-6 (figure 11). Le 25F10 interagit avec le domaine D3 de l'IL-6R $\alpha$  soluble ce qui empêche sa liaison avec le récepteur gp130. Étant donné que le domaine D3, l'un des deux domaines de FNIII de liaison aux cytokines, n'est pas impliqué dans la liaison entre l'IL-6 et le sIL-6R, il peut donc inhiber la signalisation spécifique du complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$ . Par ailleurs, un deuxième anticorps monoclonal appelé 2B10 a été également développé par le même groupe de recherche, ce dernier se lie à la forme membranaire et soluble d'IL-6R $\alpha$  et empêche la formation du complexe IL-6/IL-6R $\alpha$  (figure 11). Par conséquent, le 2B10mAb inhibe les deux voies de signalisation sauf dans le cas où le complexe est déjà formé (hyper IL-6) (50, 51).

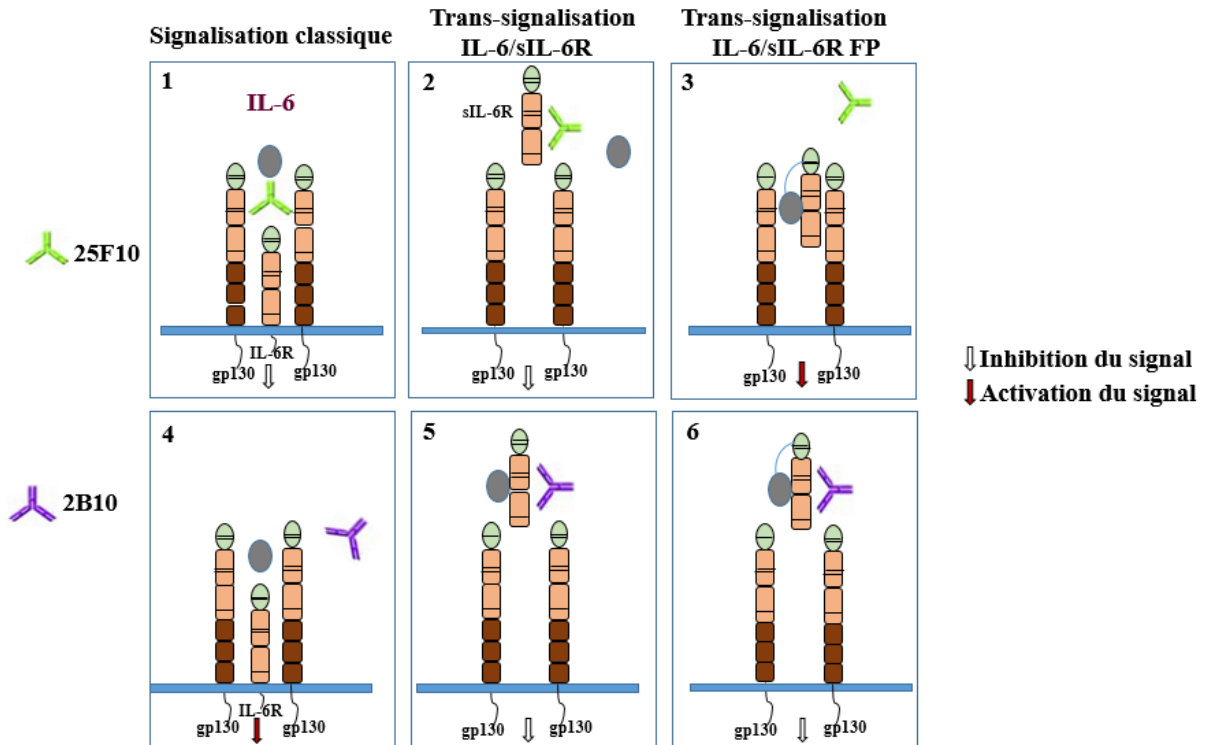


Figure 11. **Le mécanisme d'inhibition de la signalisation de l'IL-6 par les anticorps 25F10 et 2B10**

Le 2B10 est un anticorps monoclonal qui inhibe à la fois la signalisation classique et la trans-signalisation de l'IL-6 en se liant sur la forme membranaire (1) et soluble (2) de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-6. Le 2B10 empêche donc la formation du complexe entre l'IL-6 et la chaîne IL-6R $\alpha$ . Dans le cas où le complexe est déjà formé, le 2B10 ne peut pas bloquer le signal de la trans-signalisation induit par la protéine de fusion IL-6/sIL-6R (3). Le 25F10 a été développé pour inhiber uniquement la trans-signalisation (5). Le 25F10 interagit avec un domaine situé sur le récepteur soluble IL-6R $\alpha$  qui est nécessaire pour la liaison avec le récepteur gp130 et l'induction de signal. Ce même domaine n'est pas accessible à l'anticorps sur la forme membranaire de l'IL-6R. Le 25F10 n'a donc pas le pouvoir d'inhiber la signalisation classique (4). Contrairement à l'anticorps 2B10, le 25F10 inhibe la trans-signalisation induite par la protéine fusion IL-6/sIL-6R (6).

Les souris transgéniques qui expriment le cDNA codant pour le sIL-6R $\alpha$  humain sous le contrôle du promoteur du foie sont aussi utilisées pour l'étude de la trans-signalisation *in vivo* (52). En effet, l'IL-6 murin ne reconnaît pas le récepteur humain de l'IL-6 (53). Ces souris ne présentent donc aucun phénotype. Par contre, quand elles sont injectées avec l'IL-6 humain, le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  humain se forme et active par la suite le récepteur gp130 murin. Les souris exprimant le récepteur humain de l'IL-6 peuvent aussi être croisées avec les souris transgéniques exprimant l'IL-6 humain. Les souris doubles transgéniques pour le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  humain répondent à la trans-signalisation de l'IL-6 et leur phénotype se caractérise par une augmentation de l'hématopoïèse (52).

### **3.3.5. L'IL-6 : une cytokine à rôles multiples**

L'induction de la synthèse d'immunoglobulines par les cellules B activées est l'une des premières fonctions attribuées à l'IL-6. Des études ont montré que l'IL-6 pourrait avoir plusieurs rôles immunitaires et au-delà du système immunitaire (figure 12). En effet, la signalisation classique de l'IL-6 semble induire des activités régénérative et anti-inflammatoire tandis que la trans-signalisation induit des activités de type pro-inflammatoire (29).

#### **3.3.5.1. Effets régénérateurs et protecteurs de l'IL-6**

L'IL-6 joue un rôle physiologique important dans la régénération des cellules hépatiques, le contrôle du poids (54, 55) et la production des immunoglobulines de type A (56). Par exemple, les souris déficientes en IL-6 souffrent d'une pancréatite aggravée qui est causée principalement par l'inhibition des activités régénératrices (57). L'IL-6 contribue également à la reconstitution des cellules épithéliales intestinales et au maintien de la barrière protectrice contre les infections intestinales inflammatoires (58, 59). Parmi les effets anti-inflammatoires de l'IL-6 médiés par la signalisation classique est l'induction de la différenciation des cellules anti-inflammatoires M2 à partir des cellules pro-inflammatoires M1 au niveau des macrophages (60).



### 3.3.5.2. Effets pro-inflammatoires de l'IL-6

#### 3.3.5.2.1. Coordination entre le système inné et acquis et recrutement des cellules T

Les neutrophiles sont les premières cellules à se présenter dans le tissu infecté en cas d'inflammation. Le clivage protéolytique d'IL-6R $\alpha$  à la surface des neutrophiles induit la stimulation des cellules endothéliales par trans-signalisation et la sécrétion des chimiokines qui recrutent des cellules mononucléaires comme les CCL2, CCL8, et CCL7 (29, 61) et attirent les cellules T comme les CCL4, CCL5, CCL17, et CXCL10 (62). L'IL-6 contribue également à la transmigration des leucocytes en induisant l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 sur les cellules endothéliales et la L-selectine sur les lymphocytes. En plus de son rôle dans l'attraction des cellules immunitaires, la trans-signalisation par IL-6 induit la différenciation des monocytes en macrophages en augmentant l'expression du récepteur du M-CSF (63, 64).

#### 3.3.5.2.2. Activation des cellules B

L'IL-6 induit la prolifération et la maturation des cellules B. En effet, les souris déficientes en IL-6 montrent une production perturbée d'IgG après immunisation avec un antigène T-dépendant (65). Une situation clinique qui met en évidence l'effet de l'IL-6 sur l'activation des cellules B est observée dans la maladie du Castelman. Celle-ci se caractérise par une forte concentration d'IL-6 sérique induisant une hyperplasie des cellules B qui est associée à une forte concentration de la protéine c-réactive et une fièvre (66). Par ailleurs, d'autres études ont montré l'implication d'IL-6 dans la prolifération des cellules B régulatrices ce qui augmente la défense contre les maladies auto-immunes et inflammatoires. Par exemple, une inhibition spécifique d'IL-6R au niveau des cellules B augmente le risque d'arthrite *in vivo* (67).

#### 3.3.5.2.3. Régulation de la réponse des cellules Th auxiliaires

L'activation de la voie STAT3 par les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves en présence d'IL-6 et TGF- $\beta$  induit l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t aboutissant à l'initiation de la différenciation des cellules Th17 et à la sécrétion d'IL-17 et GM-CSF. L'activation des cellules

TCD4<sup>+</sup> naïves et mémoires induit le clivage du récepteur membranaire IL-6R (68) ce qui suggère que l'effet d'IL-6 observé sur les cellules Th17 est dû principalement à l'activation de la voie de trans-signalisation. En revanche, d'autres études ont révélé un rôle anti-inflammatoire d'IL-6 qui se base sur la production d'IL-10 par les cellules Th17 (69). Contrairement aux cellules Th17, l'IL-6 n'induit pas la différenciation des lymphocytes Th1/Th2, par contre elle contribue au maintien et à la survie de ces cellules. Par ailleurs, la trans-signalisation de l'IL-6 induit le développement des cellules TCD8<sup>+</sup> cytotoxiques et augmente la sécrétion du granzyme B conduisant à l'élimination des cellules infectées. IL-6 pourrait donc être bénéfique dans le développement de stratégies de vaccination (70).

#### 3.3.5.2.4. La réponse des cellules T régulatrices

L'augmentation de la réponse Th17 est à l'origine d'un déséquilibre de la balance Th17/Treg. Le rôle de l'IL-6 dans le contrôle de cette balance est bien démontré chez la souris. En effet, IL-6 réduit la production des lymphocytes Treg en diminuant l'expression du facteur de transcription Foxp3 (71, 72). En outre, dans le site d'inflammation, IL-6 est capable de reprogrammer les cellules T régulatrices sans qu'elles perdent le facteur de transcription Foxp3 ce qui permet de générer des cellules effectrices exprimant soit T-bet spécifique pour Th1 ou ROR $\gamma$  spécifique pour Th17. La différenciation des cellules Th17 à partir des cellules T régulatrices périphériques est observée dans le modèle EAE de la sclérose en plaques. En revanche, d'autres études ont montré l'effet anti-inflammatoire d'IL-6 médié par la génération des cellules Tr1 productrice d'IL-10 à partir des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves d'une manière indépendante du TGF- $\beta$ . Cet effet a été observé sur différents modèles d'inflammation auto-immune (73).

#### 3.3.5.2.5. Le métabolisme et la résistance à l'insuline

L'association de l'obésité à un état inflammatoire chronique pourrait jouer un rôle dans la résistance à l'insuline. La contribution du tissu adipeux à cet état inflammatoire chronique à travers la production des adipokines (augmentation d'IL-6 et de TNF $\alpha$  et diminution d'adiponectine) semble importante (74). L'IL-6 joue un rôle majeur dans le processus inflammatoire (29). L'IL-6 est sécrétée par les cellules musculaires après un exercice, et par les

adipocytes des individus obèses. *In vitro*, l'IL-6 est capable d'inhiber la réponse à l'insuline des adipocytes, des hépatocytes et des myocytes. *In vivo*, les souris déficientes en IL-6 développent une obésité retardée qui se caractérise par une intolérance au glucose due à une résistance à l'insuline ainsi que des signes de l'inflammation hépatique (29). Les effets d'IL-6 sur le contrôle hépatique, la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose sont principalement dus à la signalisation classique (75) en activant la phosphorylation des MAPK, la voie principale de la diffusion d'insuline. En outre, une infusion d'IL-6 chez les humains sains volontaires améliore la sensibilité à l'insuline (76).

#### 3.3.5.2.5. Autres rôles attribués à d'IL-6

Plusieurs cytokines inflammatoires activent l'endothélium vasculaire. Les cellules endothéliales humaines n'expriment pas le récepteur membranaire d'IL-6 et donc répondent uniquement à la trans-signalisation d'IL-6 en activant la voie de signalisation STAT3. L'activation des cellules endothéliales en réponse à l'IL-6 stimule l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1, la sécrétion des chimiokines IL-8 et MCP-1, et la relâche d'IL-6 (48, 77).

L'homéostasie des os est régulée par la balance des ostéoblastes et les ostéoclastes. La formation des ostéoclastes est due à l'activation de la voie de trans-signalisation de l'IL-6. Le ligand RANKL est un facteur important de la différenciation des ostéoclastes à partir des précurseurs myéloïdes. L'expression du ligand RANKL est induite par le complexe IL-6/sIL-6R (78). La neutralisation de l'IL-6 par un anticorps anti-IL-6 inhibe la formation des ostéoclastes (79). En revanche, le rôle de l'IL-6 dans l'altération de la densité minérale de l'os est controversé. Des publications ont montré que l'IL-6 inhibe la signalisation du ligand RANKL dans les cellules précurseurs des ostéoclastes et prévient donc leur formation en induisant l'expression des gènes qui codent pour des phosphatases et d'autres qui sont impliqués dans le processus d'ubiquitination (80). En plus, les souris IL-6<sup>-/-</sup> se caractérisent par une résorption osseuse associée à une augmentation du nombre des ostéoclastes (81).

Lors de certaines études menées chez des humains, un lien a été constaté entre un taux élevé d'IL-6 et un risque accru de tumeurs (82). D'autres observations ont montré l'impact de l'IL-6 à travers l'activation de la voie STAT3 dans différents types de cancers comme le cancer épithélial et colorectal (83, 84). Plusieurs évidences suggèrent que l'IL-6 inhibe l'apoptose, et stimule l'angiogenèse et la résistance aux médicaments antitumoraux (85, 86). Les cellules cancéreuses du sein qui répondent au traitement n'expriment pas l'IL-6 contrairement à celles qui sont résistantes au médicament (87). La résistance au médicament antitumoral dans le traitement du neuroblastome est associée à une phosphorylation élevée de STAT3 (86). D'autre part, IL-6 aussi diminue l'efficacité de la chimiothérapie en augmentant l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques (88). C'est ainsi que l'inhibition de la signalisation d'IL-6 est l'une des approches thérapeutiques possibles dans le traitement contre le développement du cancer. L'anticorps humanisé anti-IL-6 est capable d'augmenter la cytotoxicité induite par le dexaméthasone *in vivo* dans un modèle de myélome multiple (89). En plus, l'anticorps monoclonal chimérique CNTO328 (siltuximab) qui inhibe la voie STAT3 induite par l'IL-6 neutralise l'effet d'IL-6 dans différentes lignées cellulaires de cancer humain comme le myélome multiple, le cancer ovarien et le cancer de prostate. Le CNTO328 est en évaluation clinique (Phase II). Les premières observations montrent que le CNTO328 diminue la progression de la maladie chez plus de 50% des patients souffrant du cancer du rein sans induire des effets secondaires néfastes. La même molécule est en essais cliniques pour plusieurs d'autres types de cancer comme le myélome multiple et le cancer de la prostate (90).

Généralement, à l'état normal, la concentration sanguine du sIL-6R $\alpha$  et sgp130 dépasse celle d'IL-6 ce qui induit la neutralisation d'IL-6 systémique, tandis qu'elle est relativement faible en cas d'inflammation (91). De même, la concentration du sIL-6R $\alpha$  est faible chez les individus ayant un polymorphisme nucléotidique (SNP) de l'enzyme ADAM17 responsable du clivage de la forme membranaire d'IL-6R $\alpha$ , ce qui en résulte une protection contre des maladies cardiovasculaires et auto-immunes (92).

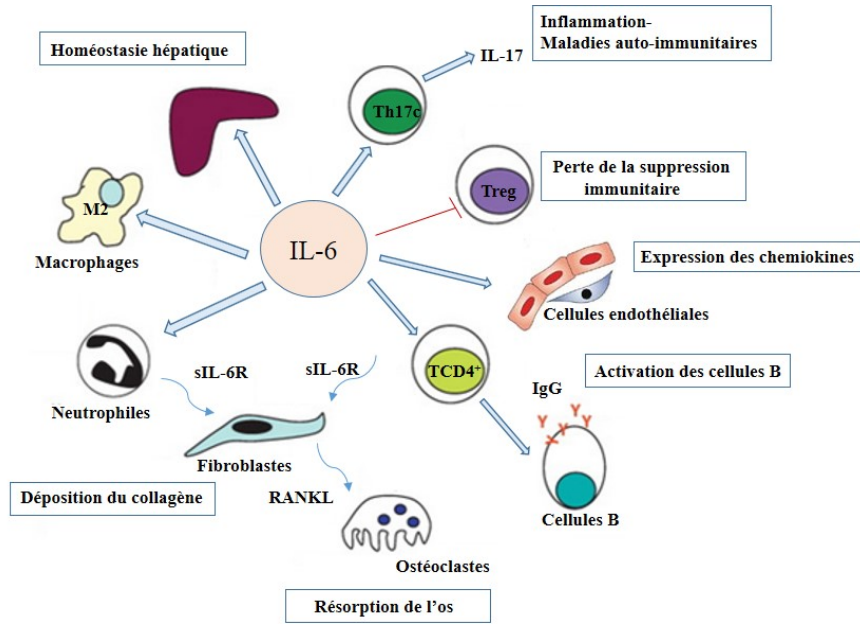


Figure 12. **Représentation schématique des différents rôles de l'IL-6**

IL-6 joue un rôle multiple immunitaire et au-delà du système immunitaire. La signalisation classique de l'IL-6 induit la régénération des cellules hépatiques et la différenciation des cellules anti-inflammatoires M2. Le clivage protéolytique de l'IL-6R sur les neutrophiles active les cellules endothéliales et les fibroblastes qui ne répondent pas à la signalisation classique de l'IL-6. Cette activation favorise l'expression des chimiokines par les cellules endothéliales et induit la transcription du ligand RANKL par les fibroblastes menant à la formation des ostéoclastes, la déposition du collagène et la résorption de l'os. L'IL-6 agit également sur les cellules T en favorisant la polarisation des cellules inflammatoires Th17 et inhibant celles des cellules immunosuppressives Treg. L'IL-6 pourrait aussi stimuler les cellules B et induire leur maturation et leur production des anticorps de type IgG.

### 3.3.6. Approches thérapeutiques ciblant l'IL-6

Le tocilizumab, est un anticorps monoclonal humanisé qui bloque l'action de l'IL-6Ra approuvé cliniquement par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (US FDA) en janvier 2010 pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde par voie intraveineuse (93) et d'autres maladies auto-inflammatoires comme la maladie Castelman et la maladie de Crohn (94).

Le tocilizumab inhibe à la fois la voie classique et en trans de l'IL-6. Le traitement par le tocilizumab est aussi efficace que celui du TNF- $\alpha$  ce qui indique que l'IL-6 joue un rôle clé dans le développement et le maintien de maladies auto-immunes (95). De plus, une étude pilote conduite sur 29 patients atteints de la neuromyéélite optique par injection mensuelle du tocilizumab montre une inhibition de la douleur et une efficacité remarquable durant les 12 mois qui suivent le traitement (96). Le siltuximab, un autre anti-IL-6R est en phase I des essais cliniques contre le myélome multiple (97). Une petite molécule sélective qui inhibe la voie de signalisation JAK (ex, tofacitinib) montre également une réponse efficace en phase II d'essais cliniques chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde. Cette molécule est actuellement approuvée par la «FDA» aux États-Unis (98).

Bloquer la cytokine IL-6 elle-même par un anticorps humanisé est aussi connu pour avoir des effets bénéfiques dans différentes pathologies. Les thérapies qui ciblent l'IL-6 pourraient inhiber les effets protecteurs de cette cytokine et induire une variété d'effets secondaires comme la fièvre. Différents anticorps humanisés sont élaborés contre l'IL-6. Par exemple, le sirukumab a été prouvé cliniquement contre l'arthrite rhumatoïde, les essais cliniques en phase III sont en cours (99).

Les activités pro-inflammatoires d'IL-6 sont dues principalement à la voie de la trans-signalisation de l'IL-6 alors que la signalisation classique est considérée plutôt protectrice (100, 101). L'inhibition spécifique de trans-signalisation pourrait diminuer l'incidence des effets secondaires. L'efficacité de l'utilisation du sgp130Fc a été démontrée dans différents modèles pathologiques. Par exemple, le traitement de souris atteintes d'athérosclérose avec la molécule le sgp130 diminue l'incidence de la maladie (102). Dans un modèle murin d'asthme expérimental, il a été également observé que le sgp130 réduit la concentration sérique en IL-4, IL-5 et IL-13 ce qui suggère une réduction des cellules Th2 (103). L'effet du sgp130 dans la réduction de la progression des lésions atherosclerotiques, l'inhibition de l'infiltration des macrophages vers les plaques atherosclerotiques et la suppression de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales a été récemment prouvé chez les souris LDLR<sup>-/-</sup> qui se caractérise par une hyper cholestérolémie (29, 102).

D'autre part, le développement de la résistance à l'insuline a été observé suite à l'inhibition des deux voies de signalisation d'IL-6. L'inhibition spécifique de la trans-signalisation d'IL-6 en présence du sgp130 empêche le recrutement des macrophages, mais n'agit pas sur la prise de poids (102). Par ailleurs, le traitement d'arthrite rhumatoïde par le tocilizumab entraîne une prise de poids, une hypercholestérolémie, une hyperlipidémie en plus d'une infection bactérienne (104, 105). Dans ce contexte, le traitement de l'arthrite rhumatoïde en bloquant uniquement la trans-signalisation d'IL-6 pourrait réduire les effets métaboliques négatifs induits par le tocilizumab, un anticorps anti-IL-6.

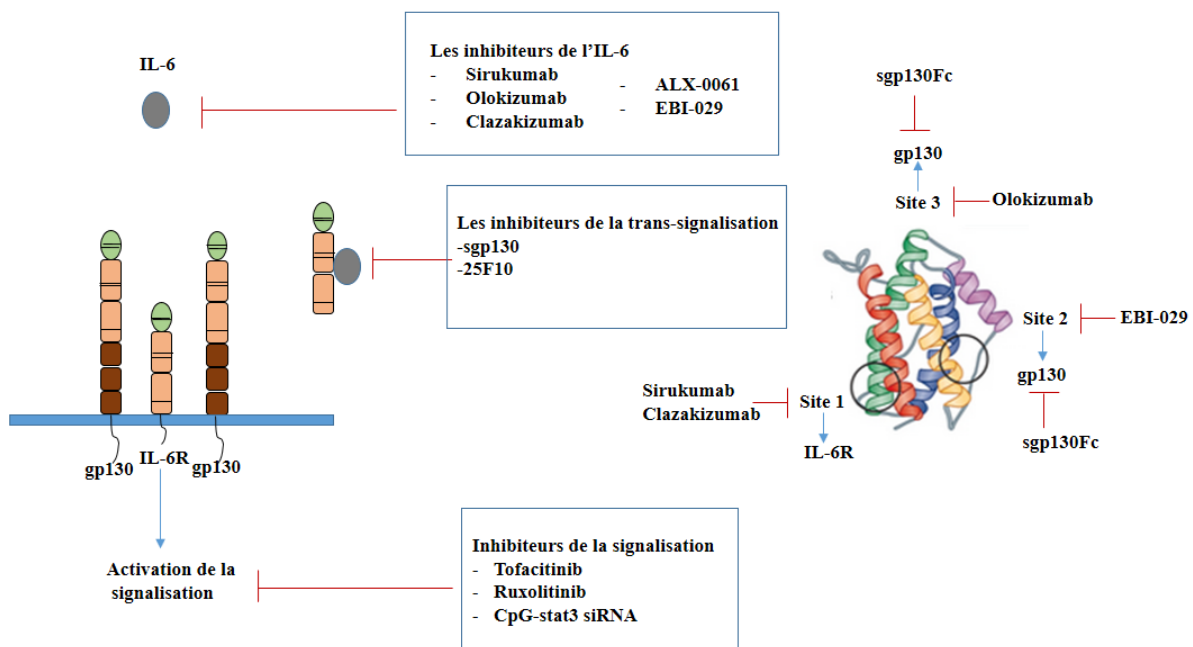


Figure 13. **Schéma représentatif de différents anticorps ciblant l'IL-6 dans les essais précliniques et cliniques**

L'utilisation des anticorps qui inhibent directement l'IL-6, des inhibiteurs de la trans-signalisation ou des bloqueurs de la signalisation induite par l'IL-6 ont été développés pour cibler les effets pro-inflammatoires de l'IL-6. À droite, une représentation des sites ciblés par les inhibiteurs de l'IL-6 (par exemple, Olokizumab se fixe sur le site 3 ce qui inhibe la liaison avec le récepteur gp130 tandis que le Sirukumab agit sur le site 1 qui bloque la formation du complexe entre l'IL-6 et l'IL-6R $\alpha$ ).

### **3.4. Interleukine-27**

L'IL-27 est une cytokine hétérodimérique formée par l'association de la chaîne p28 (IL-30) et du récepteur soluble EBI3 (106). Les premières études visant à déterminer le profil d'expression de l'IL-27 ont été réalisées sur des banques de cDNA humaines et murines par RT-PCR quantitative. Elles indiquent que l'IL-27 est exprimée principalement par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) et les cellules dendritiques (DC) suite à l'activation des récepteurs Toll et la sécrétion des cytokines inflammatoires (106, 107). C'est une cytokine qui a des fonctions à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires durant la réponse immune adaptative (108).

#### **3.4.1. Identification et caractéristiques structurales de la sous-unité EBI3 et p28 de l'IL-27**

EBI3 est une glycoprotéine soluble d'environ 35 KDa qui présente une homologie avec la sous-unité p40 de l'IL-12 (27% d'identité en acides aminés) et au récepteur du CNTF (30% d'identité en acides aminés). EBI3 est une protéine fortement glycosylée. Une grande fraction des molécules d'EBI3 est retenue dans le réticulum endoplasmique (RE). Dans ce compartiment, EBI3 s'associe avec la calnexine, une molécule chaperon qui s'associe à de nombreuses glycoprotéines, et joue un rôle clé dans l'assemblage des complexes multiprotéiques (109).

EBI3 a été identifiée pour la première fois par criblage de banque différentielle des lignées de lymphome de Burkitt infectée *in vitro* par l'EBV (109) et dans des lymphocytes B transformés *in vitro* par l'EBV (110). L'EBI3 est induite *in vitro* par l'oncogène viral LMP1 par activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (111). Ainsi, l'expression d'EBI3 diminue après un traitement inhibant le NF- $\kappa$ B. Les cellules dendritiques et les lymphocytes T effecteurs activés montrent également une expression d'EBI3 (107, 112). Dans les tissus humains, l'EBI3 est exprimé faiblement dans les amygdales et fortement au niveau de la rate. L'EBI3 a également pu être détecté dans le sang des femmes enceintes et dans le placenta, où une très forte expression est observée (113). L'infection des cellules T humaines par le rétrovirus T-



lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1), induisant une leucémie lymphatique des cellules T, augmente également l'expression d'EBI3 dépendamment de l'IL-2 (114).

EBI3 ne possède pas de séquences d'encrage à la membrane et partage des caractéristiques structurales de la partie extracellulaire de la famille des récepteurs hématopoïétiques de type I, à savoir le motif LSDWS dans la région C-terminal et la présence de deux paires de cystéines conservées dans la partie N-terminal. Les quatre cystéines conservées sont impliquées dans la formation des ponts disulfures intramoléculaires, et ne contient donc aucun autre résidu qui peut induire la formation des ponts disulfures avec un autre partenaire (115). La liaison de l'EBI3 avec ses partenaires est donc non covalente. EBI3 existe soit sous forme homodimérique (116), ou hétérodimérique en formant un complexe non covalent avec les sous-unités p28, p35 (117) ou p19 (25).

La sous-unité p28 appartient à la famille des cytokines hématopoïétiques classe I composé de quatre hélices antiparallèles. Elle contient un peptide signal qui permet sa sécrétion en absence de l'EBI3. L'expression d'EBI3 et du p28 a lieu durant l'activation des cellules T mais une quantité détectable pourrait être observée au niveau des cellules TCD4<sup>+</sup> naïves, les cellules TCD4<sup>+</sup> mémoires et aussi les cellules B (118).

### **3.4.2. Structure et profil d'expression du récepteur d'IL-27**

Le récepteur de l'IL-27 est un récepteur hétérodimérique composé par une chaîne  $\alpha$  (IL-27R $\alpha$ , TCCR ou WSX-1) nécessaire pour la liaison de l'IL-27 et une chaîne gp130 transductrice de signal commune aux cytokines de la famille de l'IL-6. Les deux chaînes appartiennent à la famille des récepteurs aux cytokines type I. En effet, elles se caractérisent par la présence de quatre résidus cystéines et un motif WSXWSX dans la partie C-terminale. L'hétérodimérisation des deux chaînes forme un complexe qui induit l'activation du signal et aboutit aux effets biologiques de l'IL-27 (119).

La co-expression des deux chaînes est détectée sur de nombreuses cellules. L'expression de la chaîne gp130 est ubiquitaire, contrairement à l'IL-27R $\alpha$  qui est exprimé principalement par les tissus lymphoïdes. Le niveau d'expression d'IL-27R $\alpha$  est élevé au niveau des cellules T naïves et les cellules NK en comparaison avec les autres cellules à savoir les cellules endothéliales, les mastocytes, les cellules B activées, les monocytes, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques activées, et les cellules T auxiliaires (Th) polarisées (120).

### **3.4.3. La voie de signalisation activée par l'IL-27**

La chaîne IL-27R $\alpha$  (WSX-1) présente le motif «box 1» qui assure l'interaction avec les protéines JAK kinases au niveau de la portion cytoplasmique du récepteur. La liaison avec le ligand et l'hétérodimérisation du récepteur formé d'IL-27R $\alpha$  et gp130 induit l'activation des JAKs associées et la phosphorylation des résidus de tyrosines intracellulaires des deux chaînes induisant le recrutement des STATs. Contrairement aux autres cytokines de la famille IL-6, IL-27 induit une forte phosphorylation de STAT1 mais aussi l'activation d'autres STATs comme STAT3 et STAT6. Le site des liaisons des STATs sur la chaîne IL-27R $\alpha$  est spécifique pour STAT1(121). IL-27 peut également activer la voie ERK, p38 MAPK dans les cellules intestinales épithéliales et les hépatocytes. L'activation de la voie ERK et p38MAPK est aussi nécessaire pour la différenciation des cellules Th1 et la régulation d'IL-12R $\beta$ 2 médiée par l'IL-27 (122, 123). Les protéines SOCS contrôlent l'activation de la voie STAT. Dans ce contexte, l'IL-27 induit l'expression des SOCS3 qui inhibe la différenciation des cellules Th17(124).

### **3.4.4. Les activités biologiques associées à l'IL-27**

#### **3.4.4.1. La réponse immunitaire Th1**

Le premier rôle attribué à l'IL-27 est l'induction de la prolifération des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> naïfs humains et murins activés, mais est sans effet sur la prolifération des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> mémoires. L'IL-27 induit l'expression du facteur de transcription T-bet chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (121, 125, 126), ce qui induit l'expression de la deuxième chaîne du récepteur de l'IL-12 (IL-12R $\beta$ 2) à la surface de ces cellules (121). La chaîne IL-12R $\beta$ 2 en association avec IL-12R $\beta$ 1 permet alors l'activation du signal par l'IL-12 et la différenciation

terminale de ces cellules en cellules effectrices Th1 qui se caractérisent par la sécrétion d'INF- $\gamma$ . L'effet de l'IL-27 sur la polarisation Th1 est donc médié en synergie avec l'IL-12. L'utilisation des souris déficientes pour STAT1 a montré l'implication de cette voie de signalisation dans l'initiation de la réponse Th1 par l'IL-27, cependant, l'effet sur la prolifération des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> naïfs activés a lieu d'une manière indépendante de la voie STAT1 (127).

Ces observations *in vitro* s'accordent avec le phénotype des souris IL-27R $\alpha^{-/-}$  qui montre une détérioration de la réponse Th1 et une susceptibilité accrue à l'infection par une variété de pathogènes intracellulaires (128). En revanche, le rôle de l'IL-27 dans l'induction de la réponse Th1 est controversé. L'inhibition de la réponse de type Th1 chez les souris IL-27R $\alpha^{-/-}$  pourrait être indirectement liée à l'initiation de la polarisation Th2, mais pas à l'IL-27 elle-même. Plusieurs évidences suggèrent que l'IL-27 pourrait réprimer la réponse Th1 dans différents contextes. Par exemple, durant l'infection chronique avec la *Leishmania* ou bien de la *Mycobacterium tuberculosis*, les souris IL-27R $\alpha^{-/-}$  et EBI3 $^{-/-}$  ont été capable de développer une réponse Th1 protectrice, de plus, leur profil est comparable aux souris contrôles (129) tandis que l'effet de la neutralisation de la fonction de p28 *in vivo* inhibe la réponse Th1 dans le modèle d'arthrite expérimentale chez le rat (130).

Plusieurs observations pourraient expliquer l'effet controversé d'IL-27 sur la suppression de la réponse Th1. D'une part, des études ont montré l'effet de l'IL-27 dans l'inhibition de la production de l'IL-2 à partir des lymphocytes T par l'activation du SOCS3 qui réprime l'activité transcriptionnelle du facteur STAT (131). Étant donné que l'IL-2 joue un rôle important dans la différenciation des cellules Th1, l'effet de l'IL-27 sur la suppression de la réponse Th1 pourrait être le résultat de l'inhibition des fonctions de type IL-2. D'autre part, d'autres études réalisées sur le modèle expérimental EAE de la sclérose en plaques ont montré la contribution d'IL-27 dans l'expansion des cellules Tr1 et la production d'IL-10, une cytokine qui joue un rôle dans la régulation des réponses inflammatoires et l'inhibition de la réponse Th1 (132).

#### **3.4.4.1. La réponse immunitaire Th2**

En plus de son rôle sur la réponse Th1, des études réalisées sur des souris IL-27R $\alpha^{-/-}$  ont mis en évidence l'importance de l'IL-27 dans l'inhibition de la réponse de type Th2 induite en présence d'IL-4. L'effet inhibiteur de cette cytokine sur l'induction des Th2 explique la réponse amplifiée dans le modèle d'asthme expérimental chez les souris IL-27R $\alpha^{-/-}$ . D'ailleurs, l'administration de l'IL-27 dans un modèle d'asthme atténue la réaction allergique induite par la réponse Th2 (133). En outre, une augmentation de la réponse Th2 est aussi observée chez les souris IL-27R $\alpha^{-/-}$  dans les modèles expérimentaux spontanés de lupus érythémateux disséminé (134). L'un des mécanismes moléculaires qui explique l'effet de l'IL-27 sur la modulation de la réponse Th2 est l'inhibition du facteur de transcription GATA-3 par l'activation de la voie STAT1 (127).

#### **3.4.3.2. La réponse immunitaire Th17**

Des observations *in vitro* ont montré l'effet inhibiteur de l'IL-27 sur la polarisation Th17 à travers l'induction des cellules régulatrices Tr1 et la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Dans ce contexte, IL-27 bloque l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$  nécessaire pour l'initiation de la réponse Th17 par activation de la voie STAT1 et partiellement STAT3 (135, 136). En plus d'IL-17, les cellules Th17 produisent du GM-CSF connu pour causer l'inflammation auto-immune. Il a été observé que l'IL-27 inhibe non seulement la différenciation des cellules Th17 mais agit également sur des cellules complètement différenciées. Ainsi, la sécrétion d'IL-17 et GM-CSF est inhibée en présence d'IL-27 de manière dépendante de la voie STAT1 (137).

#### **3.4.3.3. La réponse immunitaire T régulatrice**

Des études *in vitro* ont montré l'effet inhibiteur de l'IL-27 sur la différenciation des cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> en activant la voie STAT3 (138). *In vivo*, le transfert adoptif des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques pour l'ovalbumine à partir des souris IL-27R $\alpha^{-/-}$  induit une augmentation de l'expression du facteur de transcription Foxp3 suggérant que cette cytokine pourrait inhiber l'expansion des cellules Treg. En revanche, aucun effet sur le nombre ni la fréquence des

cellules Treg n'a été observé. De plus, il a été démontré que les souris IL-27 transgéniques n'ont pas la capacité de produire l'IL-2 ce qui suggère un effet indirect de l'IL-2 dans ces observations (131).

D'autre part, les effets anti-inflammatoires de l'IL-27 suggèrent son rôle dans l'induction des cellules T régulatrices caractérisées par ses fonctions immunosuppressives. En effet, l'IL-27 induit l'expression du facteur de transcription T-bet d'une nouvelle population de cellules T régulatrices appelées Tr1, les cellules Tr1 produisent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et semblent être différentes des cellules Treg qui expriment le gène Foxp3. L'induction de l'IL-10 médiée par l'IL-27 dépend principalement de STAT1 et STAT3 (135). La voie MAP Kinase est aussi importante dans le maintien de la production de l'IL-10 par l'IL-27.

#### **3.4.3.4. La réponse TCD8<sup>+</sup> cytotoxique**

Plusieurs publications montrent l'impact de l'IL-27 dans la génération et le maintien de la réponse cytotoxique médiée par les cellules T CD8<sup>+</sup>. En activant la voie de signalisation STAT1/5, l'IL-27 induit l'expression du facteur de transcription T-bet, la production de l'INF- $\gamma$ , et l'expression de l'IL-12R $\beta$ 2 par les cellules T CD8<sup>+</sup>. En plus, l'IL-27 induit également la production du granzyme B et la perforine par les cellules T CD8<sup>+</sup> murines et humaines. Par ailleurs, l'effet de l'IL-27 sur la réponse cytotoxique des cellules T CD8<sup>+</sup> dépend du contexte inflammatoire. La génération d'une réponse cytotoxique par l'IL-27 pourrait améliorer la réponse antitumorale (139, 140).

#### **3.4.3.5. L'activation des cellules B**

Les cellules B sont la première source d'EBI3 (109). La stimulation de ces cellules en présence d'IL-27 induit la prolifération des cellules B dans le centre germinatif (141). D'autre part, l'IL-27 augmente l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 ainsi que la molécule de costimulation CD86 à la surface des cellules B ce qui favorise leur interaction avec les cellules T. Cette interaction permet par la suite l'activation de la voie STAT1 et du facteur de transcription T-bet menant à la production des immunoglobulines de type IgG2 et IgG1 (141).

#### **3.4.3.6. La réponse immunitaire innée**

L'IL-27 agit sur différentes cellules du système immunitaire inné. Par exemple, elle induit la sécrétion des cytokines et chimiokines à partir des éosinophiles et favorise leur survie en réduisant l'apoptose et en facilitant leur adhésion et accumulation *in vivo* (142). D'autre part, IL-27 inhibe l'activité des neutrophiles dans différents modèles inflammatoires ce qui suggère son rôle dans la clairance virale (143). L'IL-27 agit également sur les cellules NK. En présence d'IL-2 et IL-12, l'IL-27 augmente la production d'INF- $\gamma$  à partir des cellules NK humaines. L'activation des NK induit une réponse antitumorale et une sécrétion d'IL-10 (144).

Les cellules lymphoïdes innées (ILC2) sont caractérisées par la production d'une réponse de type 2 (Th2). L'IL-27 inhibe la prolifération et l'accumulation des ILC2 ainsi que la production des cytokines *in vivo*. Les stratégies thérapeutiques basées sur la modulation de la réponse Th2 dans certaines conditions parasitaires peuvent donc être médiées par l'IL-27 (145).

#### **3.4.3.7. Les autres rôles attribués à l'IL-27**

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'INF- $\alpha$  et  $\gamma$  jouent un rôle dans l'expansion des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des progéniteurs myéloïdes induisant la production des cellules myéloïdes matures (146). De même, l'IL-27 induit l'expansion des cellules souches reconstituant l'hématopoïèse à long terme (LT-CSH) et améliore leur potentiel de différenciation vers les cellules dendritiques migratoires, neutrophiles, mastocytes, et moins vers les macrophages et les basophiles. L'IL-27 contrôle donc l'infection en induisant l'expansion des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de phénotype LSK et la production des neutrophiles (147).

D'autre part, plusieurs études ont montré le rôle de l'IL-27 dans l'inhibition de la prolifération, la migration et les métastases de différents types de cancer, par exemple, l'IL-27 inhibe la polarisation des macrophages M2 dans le cancer pancréatique et elle pourrait donc induire des effets thérapeutiques (148). La génération de la réponse cytotoxique par l'IL-27 contrôle également la prolifération cellulaire en induisant la destruction des cellules malignes.

L'inflammation établie par les tissus adipeux joue un rôle important dans les mécanismes pathologiques liés à l'obésité et les désordres métaboliques. L'IL-27 est impliquée dans l'inflammation induite par l'obésité. Des observations récentes ont montré que les cellules adipeuses en culture sécrètent l'IL-27 en réponse à un stress inflammatoire, ces cellules répondent également à l'IL-27 ce qui suggère l'implication d'une voie autocrine/paracrine médiée par l'IL-27 sur les tissus adipeux (149).

### **3.4.5. Le rôle de la sous-unité p28 indépendant de l'IL-27**

L'association entre la p28 et l'EBI3 est non covalente. Ainsi, plusieurs observations ont montré que les deux sous-unités peuvent être secrétées séparément et induire des effets indépendants de l'IL-27. Par exemple, la sous-unité p28 seule pourrait agir comme un antagoniste à faible affinité des cytokines qui induisent le signal à travers le récepteur gp130 comme l'IL-6, IL-11, et IL-27 (150). Cette inhibition pourrait contribuer à une diminution modeste de la progression de certains modèles murins de maladies auto-immunes en réduisant la polarisation Th17 (124, 151), et une neutralisation de la réponse cellulaire de type B dépendante du gp130 (150).

Plusieurs observations ont démontré que la sous-unité p28 peut former un complexe avec CLF. Comme IL-27, le complexe p28/CLF est secrété par les cellules dendritiques, mais il requière un récepteur dimérique composé du gp130 et IL-6R $\alpha$  pour la signalisation. Le complexe p28/CLF augmente la prolifération des cellules TCD4 naïve, contrairement à l'IL-27, p28/CLF induit l'expression d'IL-17 en présence du TGF- $\beta$ . Le complexe p28/CLF a des effets de type IL-6 en induisant le même niveau d'expression d'IL-17 (152, 153).

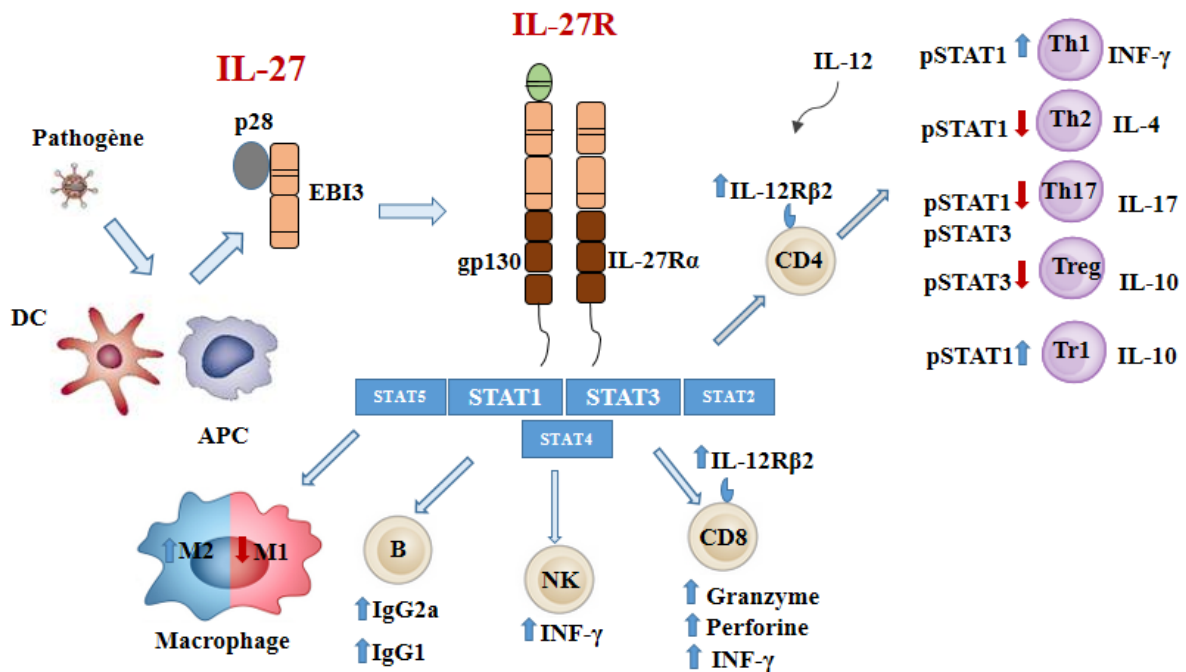


Figure 14. **Représentation schématique de différents rôles de l'IL-27**

La production de l'IL-27 (EBI3/p28) par les cellules présentatrices d'antigène (APC) induit l'activation des cellules qui expriment le récepteur de l'IL-27 et la phosphorylation de différentes voies de signalisation, principalement la voie STAT1 et STAT3. Le rôle anti-inflammatoire de l'IL-27 est caractérisé par la formation des macrophages de type M2, l'inhibition des cellules pro-inflammatoires Th17 et l'induction des cellules immunosuppressives Tr1. D'autre part, l'IL-27 induit des réponses pro-inflammatoires en induisant la production des anticorps par les cellules B, l'expression d'INF-γ par les cellules NK, la polarisation Th1 par les cellules TCD4<sup>+</sup> et la production de granzyme, perforine et INF-γ par les cellules TCD8<sup>+</sup>. L'IL-27 exerce des effets indirects de type IL-12 sur les lymphocytes T en induisant l'expression de la chaîne IL-12Rβ2 à la surface des cellules TCD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.



### 3.4.6. L'utilisation de l'IL-27 dans les approches thérapeutiques

L'IL-27 montre des capacités anti-inflammatoires *in vivo* sur la base de la régulation négative du développement des cellules Th17 d'une manière dépendante du facteur de transcription ROR- $\gamma$ , et l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 par les cellules Tr1 (154, 155). L'injection d'IL-27 constitue une des approches thérapeutiques contre les maladies auto-immunes qui se caractérisent par une différenciation des cellules Th17. Par exemple, l'injection d'IL-27 en utilisant des pompes osmotiques inhibe le développement de la sclérose en plaque dans le modèle souris EAE (156). De plus, des études *in vitro* indiquent l'effet de l'IL-27 dans la modulation de la réponse immunitaire des astrocytes primaires d'origine humaine (157). Le traitement avec l'IL-27 pourrait donc influencer non seulement le système immunitaire périphérique, mais aussi le CNS. D'autre part, l'administration locale intra-articulaire de l'IL-27 recombinante réduit les symptômes d'arthrite rhumatoïde dans le modèle de souris CIA qui se caractérise par une diminution de l'infiltration cellulaire dans les articulations et le liquide synovial (158). Par ailleurs, l'effet de l'IL-27 sur la maladie de psoriasis est controversé. IL-27 induit le développement du psoriasis à travers l'induction de la différenciation des cellules inflammatoires Th1 dans un modèle murin de cette maladie (159). Étant donné que la différenciation en Th17 est la principale cause de cette maladie auto-immune et sachant que la sécrétion d'IL-17 par les cellules épidermiques est élevée, l'application d'IL-27 comme une approche thérapeutique reste imaginable. Le traitement d'autres maladies pourrait aussi être envisageable à travers les propriétés anti-inflammatoires d'IL-27. Par exemple, les Th17 sont connus parmi les médiateurs de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Le rôle de l'IL-27 dans l'inhibition de la différenciation des Th17 pourrait donc diminuer l'incidence de cette pathologie. D'autre part, il a été observé récemment que l'IL-27 régule la voie de signalisation du TGF- $\beta$  qui induit la progression de la fibrose pulmonaire (160).

L'un des objectifs thérapeutiques majeurs dans le traitement antitumoral est le développement de vaccins basés sur l'activation des cellules cytotoxiques TCD8<sup>+</sup>. L'IL-27 pourrait donc être un outil thérapeutique pour augmenter l'efficacité du vaccin vu son effet sur la prolifération et l'expansion des cellules T CD8<sup>+</sup> (161). L'activité antitumorale de l'IL-27 induite par activation des cellules T cytotoxique a été observée dans plusieurs modèles tumoraux

(162-164). IL-27 exerce aussi un effet antitumoral à travers plusieurs autres mécanismes. Par exemple, IL-27 augmente la réponse des cellules NK qui peuvent détruire les cellules cancéreuses. En plus, l'effet direct de l'IL-27 sur la prolifération cellulaire a été observé dans un modèle murin de mélanome par l'induction de l'expression des facteurs anti-angiogéniques (165). L'injection de l'IL-27, à des modèles murins de cancer du poumon, réduit l'expression du COX-2 et son métabolite PGE<sub>2</sub> qui inhibe par la suite l'invasion et la migration cellulaire (166). Une étude récente montre que l'administration d'IL-27 *in vivo*, en utilisant la technique de la sonoporation, réduit la prolifération cellulaire, augmente le nombre des cellules effectrices et normalise la structure de l'os dans un modèle murin de cancer de prostate métastatique (167).

### **3.5. Interleukine-35**

L'IL-35 est l'une des cytokines hétérodimères de la famille IL-12 composée de la sous-unité p35 et du récepteur soluble EBI3 (168). IL-35 est une cytokine immunosuppressive et un régulateur critique de la réponse immunitaire dans différents modèles de maladies auto-immunes et inflammatoires (169, 170).

#### **3.5.1. Identification et caractéristiques structurales de la sous-unité p35**

La sous-unité p35 appartient à la famille des cytokines class I qui se caractérise par la présence de quatre hélices  $\alpha$  antiparallèles. En plus de l'IL-35, la sous-unité p35 peut aussi interagir avec la sous-unité p40 pour former l'IL-12. La sous-unité p35 est sécrétée de façon ubiquitaire en réponse à l'INF- $\gamma$  et aux agonistes de TLR3, 4 ou 7. Les deux sous-unités EBI3 et p35 s'accumulent sous une forme immature dans le réticulum endoplasmique quand elles sont exprimées seules (168), ainsi, la co-expression des deux sous-unités facilite leur sécrétion. L'EBI3 comprend quatre résidus cystéines responsables des interactions disulfures intramoléculaires (115). La liaison entre l'EBI3 et la sous-unité p35 est une liaison non covalente et ne dépend pas des ponts disulfures.

### 3.5.2. Expression et caractéristiques structurales du récepteur de l'IL-35

L'IL-35 induit l'activation du signal sur les lymphocytes T à travers un récepteur hétérodimère composé de la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-12 (IL-12R $\beta$ 2) et la sous-unité gp130 commune à la famille IL-6 (figure 15). La liaison de l'IL-35 sur l'IL-12R $\beta$ 2 et la sous-unité gp130 induit l'hétérodimérisation de la voie STAT1/4. Par ailleurs, en absence d'une des deux chaînes du récepteur *in vivo*, l'effet de l'IL-35 reste intact. L'une des particularités du récepteur de l'IL-35 est la possibilité d'induire le signal par homodimérisation. En effet, l'IL-35 peut interagir et induire le signal à travers la combinaison des récepteurs (IL-12R $\beta$ 2-IL-12R $\beta$ 2) ou (gp130-gp130). L'activation de la forme homodimère des chaînes de récepteurs de l'IL-35 entraîne l'initiation d'une seule voie de signalisation soit STAT1 ou STAT4 d'une manière dépendante de la chaîne du récepteur activée (171, 172). L'activation de la forme hétérodimérique du récepteur de l'IL-35 est donc nécessaire pour atteindre un effet optimal de l'IL-35.

Une autre particularité du récepteur de l'IL-35 c'est qu'il diffère selon le type cellulaire. Contrairement aux cellules T, l'IL-35 active la voie de phosphorylation STAT1 et STAT3 par l'interaction avec un récepteur hétérodimérique composé de la chaîne  $\beta$  de l'IL-12 (IL-12R $\beta$ 2) et la chaîne  $\alpha$  de l'IL-27 (IL-27R $\alpha$ ) sur les cellules B (figure 15). Des études sont en cours pour examiner l'implication du gp130 ou la forme homodimérique de ce récepteur dans la signalisation sur les cellules B (170).

Le récepteur gp130 est exprimé d'une façon ubiquitaire, tandis que l'IL-12R $\beta$ 2 est exprimé principalement par les cellules T actives, les cellules NK, les cellules dendritiques et les cellules B. L'expression d'IL-12R $\beta$ 2 est fortement observée au niveau des cellules Th1 et leur expression est corrélée à la réponse de l'IL-12 et l'IL-35 (173).

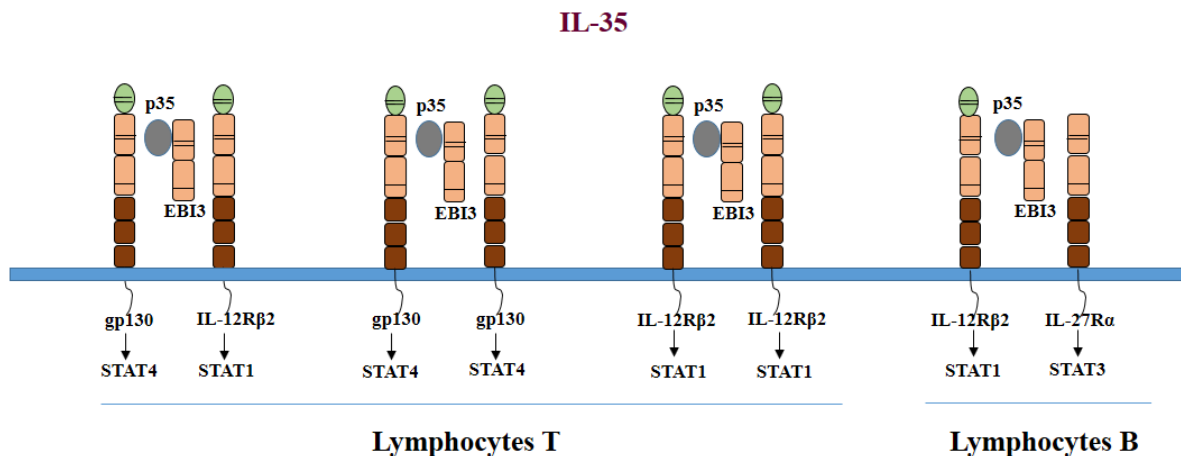


Figure 15. **Représentation schématique des différents récepteurs de l'IL-35**

L'IL-35 peut interagir et induire le signal à travers la combinaison de différents récepteurs qui varient selon le type cellulaire. À la surface des cellules T, l'IL-35 induit l'activation de la voie STAT1 et STAT4 en se liant soit sur la forme homodimérique des chaînes gp130 et IL-12Rβ2 ou sur le complexe hétérodimérique IL-12Rβ2/gp130. À la surface des cellules B, l'IL-35 active la voie STAT1 et STAT3 en se liant sur un récepteur hétérodimérique IL-12Rβ2/IL-27Rα.

### 3.5.3. Activités biologiques de l'IL-35

#### 3.5.3.1. La régulation des cellules T

Depuis sa découverte, l'IL-35 a été suggérée comme une cytokine qui pourrait jouer un rôle important dans la modulation immunitaire. L'EBI3 est l'un des gènes qui sont fortement régulés par les cellules T régulatrices. Des publications ont confirmé aussi la sécrétion constitutive du complexe EBI3/p35 uniquement par les cellules T régulatrices, mais pas les cellules T naïves ou effectrices (174). L'IL-35 induit une nouvelle population des cellules T reg qui ne dépend pas de l'IL-10 ni du TGF-β. Cette nouvelle population, appelée iTr35, produit de l'IL-35 endogène (175), inhibe la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et la différenciation des Th17 alors qu'elle induit l'expansion des cellules T reg Foxp3<sup>+</sup>, ce qui laisse croire que l'IL-35 est nécessaire pour atteindre l'effet maximal des cellules T reg (176).

### 3.5.3.1. La régulation des cellules B

Les cellules B répondent à l'IL-35 à travers l'activation de deux chaînes de récepteurs IL-12R $\beta$ 2 et IL-27R $\alpha$  (170). En effet, l'IL-35 inhibe la prolifération des cellules B et induit la formation des cellules B régulatrices productrices de l'IL-10 appelés i10-Bregs par activation de la voie STAT1 et STAT3. Le phénotype de ces cellules est similaire à celui des cellules régulatrices B10 décrites avant par le groupe Tedder (177). Par ailleurs, la stimulation des cellules i10-Bregs ou des cellules B conventionnelles en présence d'IL-35 augmente l'expression de l'IL-35 endogène et induit la formation des cellules B régulatrices i35- Bregs productrices de l'IL-10 et IL-35 (169).

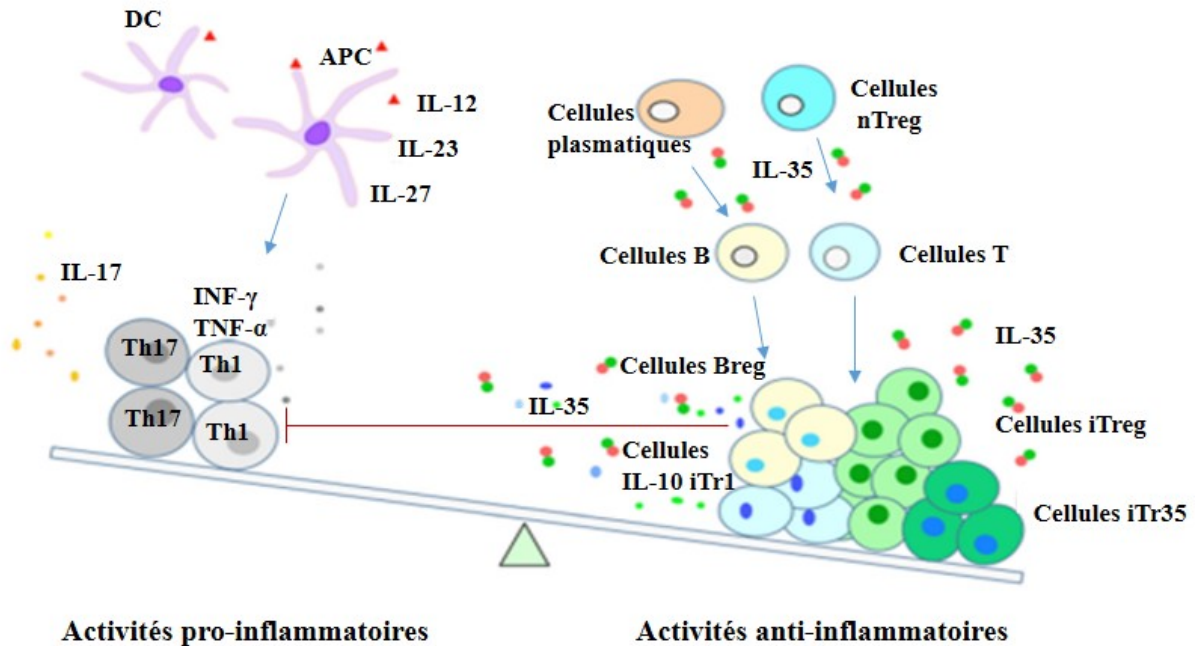


Figure 16. **Représentation schématique du rôle anti-inflammatoire de l'IL-35**

L'IL-35 est une cytokine immunosuppressive. Elle induit la différenciation d'une nouvelle population de cellules T régulatrices productrices de l'IL-35 appelée iTr35. Sur les cellules B, l'IL-35 induit la formation des cellules B régulatrices (Breg). Les lymphocytes T et B régulateurs agissent en inhibant la prolifération et la différenciation des cellules pro-inflammatoires Th1 et Th17.

### **3.5.4. L'utilisation de l'IL-35 dans les approches thérapeutiques**

L'IL-35 induit des fonctions régulatrices lui permettant d'être un outil thérapeutique potentiel dans certaines maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes. L'injection de l'IL-35 recombinante diminue l'incidence de plusieurs maladies auto-immunes comme dans le modèle EAE de la sclérose en plaques (175), le modèle CIA d'arthrite (178), et l'uvéorétinite auto-immune expérimentale (169, 170). Par ailleurs, le rôle d'IL-35 dans le développement de la sclérose multiple (MS) chez l'humain est en question. La concentration sérique d'IL-35 ne diffère pas entre les sujets sains et ceux atteints de la MS (179). Contrairement à l'IL-27, IL-35 induit la prolifération tumorale et la suppression des cellules T cytotoxiques, ce qui suggère que l'injection de l'IL-35 ne semble pas être bénéfique dans la suppression tumorale (180).

## **3.6. CLCF1 et son partenaire CLF**

### **3.6.1. Identification et profil d'expression**

CLCF1 est une cytokine de 22 KDa appartenant à la famille d'IL-6 composée de quatre hélices  $\alpha$  et un site de glycosylation N terminal. Elle présente une homologie de séquences avec la cardiophine (CT1) d'où son nom (Cardiophin-Like Cytokine) (181). En raison de son rôle neutrophique et activateur des cellules B, le CLCF1 est appelé aussi (BSF-3 pour B cell-stimulatory factor-3 ou NNT-1 pour Neurotrophin-1) (182). CLCF1 contient un peptide signal (182) mais elle n'est sécrétée efficacement que quand elle se trouve liée au CLF (183, 184), un récepteur soluble similaire aux récepteurs des cytokines de la famille classe I (185) ou à la forme soluble de CNTFR (186). L'interaction du CLCF1 avec CLF a lieu sur le site 3, tandis que l'interaction avec le CNTFR $\alpha$  a lieu à travers le site 1 (184).

CLCF1 est exprimé principalement par les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions à la fois chez les souris et les humains ainsi que les lymphocytes périphériques, les neutrophiles et les fibroblastes synoviaux (187) ce qui suggère le rôle du CLCF1 dans le système immunitaire. Par ailleurs, l'expression du CLCF1 est aussi observée

dans d'autres organes comme la moelle osseuse, les ovaires, le placenta, les reins ce qui pourrait indiquer une fonction pléiotropique de cette cytokine (181).

### **3.6.2. Le récepteur du CLCF1/CLF**

Les souris CNTF<sup>-/-</sup> ont un phénotype normal contrairement aux souris CNTFR<sup>-/-</sup> qui décèdent durant la période néonatale. Cette observation suggère la présence d'un second ligand pour CNTFR autre que le CNTF (188). Des observations ont montré que le CLCF1 seul ou le complexe CLCF1/CLF constitue un deuxième ligand du CNTFR (183, 189). Le complexe CLCF1/CNTFR recrute par la suite la sous-unité gp130 qui est exprimée d'une façon ubiquitaire ainsi que la chaîne  $\beta$  du récepteur au LIF (LIFR $\beta$ ) (190). CLCF1 active donc un récepteur trimérique composé de la chaîne  $\alpha$  du CNTFR, la chaîne  $\beta$  du LIFR et la sous-unité gp130. La liaison du complexe CLCF1/CNTFR sur le récepteur gp130 membranaire active la voie de phosphorylation STAT3, ERK, et MAPK (185). Par ailleurs, la liaison du CLCF1 à la forme soluble du CNTFR pourrait aussi avoir un effet sur les cellules exprimant uniquement les deux chaînes gp130 et LIFR $\beta$  (191). CLCF1 induit une réponse de cellules immunitaires qui n'expriment pas le CNTFR, ce qui suggère un rôle potentiel d'un récepteur alternatif autre que le CNTFR. Par ailleurs, il a été observé que le CLCF1 comme pour son homologue CT-1 et CNTF interagit avec la sortiline. La formation du complexe CLCF1/Sortiline entraîne un «turnover» du signal induit par le complexe CLCF1/CNTFR (192).

### **3.6.3. Activités biologiques du CLCF1**

#### **3.6.3.1. La prolifération des cellules B et l'induction de la réponse humorale**

CLCF1 exerce un effet potentiel sur le fonctionnement des cellules B similaire à celui de l'IL-6. En effet, l'injection péritonéale du CLCF1 induit une hyperplasie folliculaire des ganglions lymphatiques qui se caractérise par la présence des follicules secondaires proéminents, des centres germinaux, une augmentation du nombre des cellules B (182) et de la production des anticorps (187). D'autre part, les souris CLCF1 transgéniques présentent une hyperplasie des cellules B au niveau de la rate, des ganglions et la circulation sanguine

périphérique. Une forte expression d'IgG2b, IgG3, et IgGE mais une faible expression d'IgG2a et IgG3 ont été observées. (193, 194).

### **3.6.3.2. Les fonctions neurotrophiques**

Le CNTF présente des effets neuroprotecteurs. Cependant, le CNTF n'a pas de peptide signal et semble être sécrété uniquement par les cellules endommagées (195). CLCF1 constitue un deuxième ligand pour le CNTFR. La déficience en CLCF1/CLF aboutit à un phénotype proche de celui observé chez les souris CNTFR<sup>-/-</sup> qui se caractérise par une mort périnatale et une réduction du nombre des neurones (196). Plusieurs études *in vitro* montrent l'effet du CLCF1 dans la survie des moteurs embryonnaires et les neurones sympathiques (197). De plus, CLCF1 induit la différenciation des astrocytes au niveau des cellules neuroépithéliales fœtales (198).

### **3.6.3.3. La glomérulosclérose segmentaire focale ou FSGS**

Le FSGS est un syndrome néphrotique qui touche les enfants et les adultes. Il affecte les glomérules qui jouent un rôle dans la première étape de la formation de l'urine en filtrant les déchets solubles dans le sang issus du métabolisme cellulaire. Lorsque les barrières de ce filtre sont endommagées, les protéines passent dans l'urine engendrant avec le temps une insuffisance rénale (199). Le traitement des patients souffrant de cette maladie chronique repose sur la dialyse et dans certains cas une transplantation. Actuellement, il n'existe malheureusement aucun médicament pour prévenir cette pathologie (200).

La pathologie du FGSG semble être due à des facteurs sériques appelés facteurs de perméabilité. CLCF1 est présent dans le sérum des patients atteints d'une FSGS active et a été proposé d'être parmi les facteurs de perméabilité de cette pathologie (201). Plusieurs évidences suggèrent que CLCF1 pourrait être associé avec la FSGS primaire. Des expériences réalisées sur les podocytes en culture et les glomérules ont montré que le CLCF1 induit la perméabilité à l'albumine et une diminution de l'expression rénale de la néphrine semblable à celle observée dans la pathologie FSGS. L'inhibition spécifique du CLCF1 par un anticorps monoclonal ou de la voie de signalisation STAT3 et JAK2 inhibe son effet sur la perméabilité à l'albumine (202).



JAK2/STAT3 pourrait donc être la voie de signalisation des facteurs de perméabilité circulant. Des études ont montré que le galactose pourrait lier les facteurs de perméabilités présents dans le sérum des patients souffrant de cette maladie ce qui inhibe leur activité (203). Cela suggère que l'effet du CLCF1 sur le FSGS pourrait être inhibé en présence du galactose. L'étude de l'efficacité du galactose relativement aux autres types de traitement comme anti-TNF- $\alpha$  est en cours (204).

#### **3.6.3.4. Le rôle du CLCF1 dans la fibrose pulmonaire idiopathique**

La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie rare qui se caractérise par une accumulation des myofibroblastes et la déposition du collagène dans les voies respiratoires inférieures aboutissant à une difficulté respiratoire (205). La fibrose pulmonaire idiopathique est considérée comme une maladie inflammatoire malgré l'absence d'efficacité des traitements anti-inflammatoires. L'implication des lymphocytes T dans cette maladie respiratoire est possible. Par exemple, les cellules Th1 inhibent la prolifération des fibroblastes et la synthèse du collagène contrairement aux cytokines des cellules Th2 (206).

Un criblage d'ARN messagers des gènes exprimés dans cette maladie indique une expression du CLF par les cellules alvéolaires épithéliales. Le CNTFR quant à lui est également exprimé par les cellules épithéliales alvéolaires de type I. L'administration du CLCF1/CLF induit une accumulation des cellules TCD4<sup>+</sup>, principalement les cellules Th1 et Treg et diminue l'incidence de la fibrose pulmonaire dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine chez la souris (207).

#### **3.6.3.5. Le Syndrome CISS et Crisponi**

Des mutations affectant le CLF et CLCF1 causent le syndrome de Crisponi et de la transpiration induite par le froid (CISS). Ces deux syndromes présentent des caractéristiques en communs. Ce sont des maladies autosomiques récessives qui touchent les enfants dès leurs naissances. Elles se caractérisent par une contraction musculaire faciale anormale en réponse à de faibles stimuli, une hyperthermie et une transpiration paradoxale après une exposition à de faibles températures ambiantes et une camptodactylie (208, 209). Des difficultés à

se nourrir dans la petite enfance sont aussi présentes (210). À la naissance, un contrôle anormal de la respiration centrale peut être observé et augmente le risque de la mort subite. La plupart des enfants décèdent dans les premiers mois de vie, lors d'un épisode d'hyperthermie (211).

Une réduction de l'acide  $\gamma$ -aminobutyric GABA est observée dans le fluide cébrospinal (212). Par contre, la pertinence de l'implication de cette observation dans la pathologie n'est pas encore claire. CLCF1 et CLF sont exprimés par les glandes sudoripares tissulaires (213). L'hyperthermie et le développement d'une transpiration à température ambiante chez les patients qui survivent à ces deux syndromes pourraient être dues au rôle du CLCF1/CLF dans la différenciation cholinergique des neurones sympathiques qui innervent les glandes sudoripares (212).

### **3.7. Le facteur neurotrophique ciliaire : CNTF**

#### **3.7.1. Identification, profil d'expression et récepteurs du CNTF**

Le CNTF est composé de quatre hélices  $\alpha$  faisant partie de la famille des cytokines classe I et agit sous une forme d'homodimère. Il est exprimé par les cellules de Schwann, les cellules T périphériques, et par les astrocytes dans le système nerveux central (214, 215). Le CNTF active un récepteur trimérique composé de la chaîne  $\alpha$  du CNTFR, gp130 et LIFR $\beta$  (figure 17). Le CNTF lie d'abord la chaîne  $\alpha$  du CNTFR impliquée dans l'initiation du signal. La liaison du CNTF avec le récepteur CNTFR $\alpha$ , soit sous une forme soluble ou membranaire, induit par la suite une hétérodimérisation avec la chaîne transductrice du signal gp130 et LIFR $\beta$  qui ciblent les cascades de signalisation intracellulaires (194). Par ailleurs, l'IL-6R $\alpha$  peut remplacer la chaîne  $\alpha$  du CNTFR. Dans cette condition, CNTF agit sur un récepteur composé d'IL-6R $\alpha$ , gp130 et LIFR $\beta$  (figure 17). CNTF peut également lier la forme soluble d'IL-6R $\alpha$  (216).

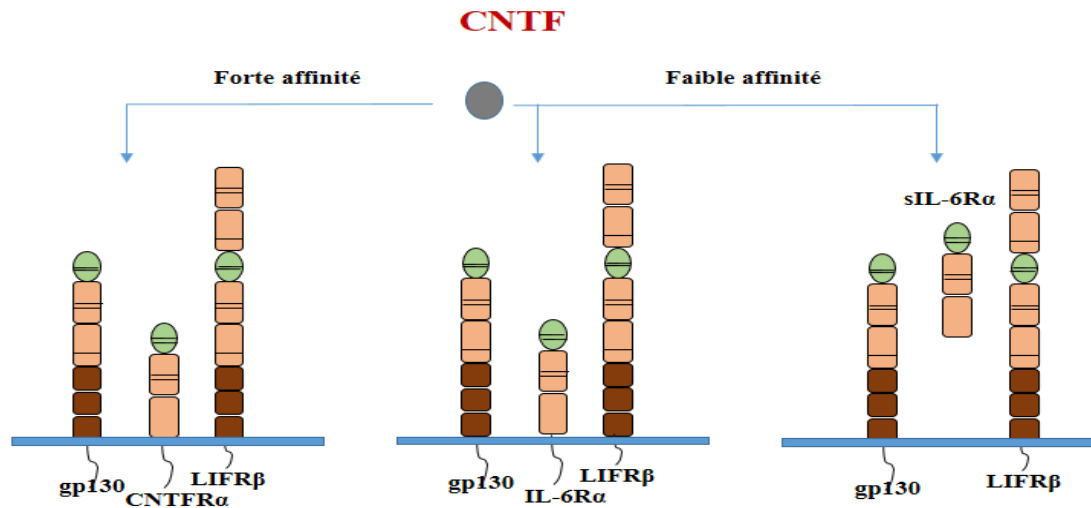


Figure 17. **Activation du signal par CNTF**

CNTF active un récepteur trimérique constitué du CNTFR $\alpha$ , gp130 et LIFR $\beta$ . L'IL-6R $\alpha$ , qu'elle soit membranaire ou soluble, peut remplacer la chaîne CNTFR $\alpha$ . Dans ce cas de figure, CNTF interagit avec un récepteur trimérique composé d'IL-6R $\alpha$ , gp130 et LIFR $\beta$ . L'affinité du CNTF envers la chaîne CNTFR $\alpha$  demeure plus forte que celle avec la chaîne IL-6R $\alpha$ , qu'elle soit membranaire ou soluble.

### 3.7.2. Fonctions biologiques du CNTF

#### 3.7.2.1. Effets neuroprotecteurs

Les souris déficientes en CNTF (CNTF<sup>-/-</sup>) présentent un phénotype qui reflète une dégénérescence progressive des neurones moteurs et une réduction de la force musculaire durant la phase adulte (188). Le phénotype dû à la déficience du CNTF est différent entre la souris et l'homme. Une mutation du CNTF chez l'homme n'est reliée à aucune maladie neurodégénérative (217). Le phénotype sévère des patients souffrant des deux syndromes de CISS et Crisponi suggère que le CLCF1/CLF serait le ligand important pour CNTFR durant le développement.

Le CNTF a un effet trophique sur les neurones à la fois *in vivo* et *in vitro* (218). Les effets neuroprotecteurs du CNTF ont conduit à des essais cliniques dans la maladie de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), une maladie neuromusculaire dont l'évolution est rapide et peut être fatale. L'efficacité des essais cliniques (phase II) requiert une forte dose du CNTF humain qui est considérée toxique pour les patients (219). L'utilisation des implants de cellules qui secrètent le CNTF a été testée en essais cliniques (phase I) afin d'éviter les effets secondaires périphériques et d'assurer l'apport de cette neurocytokine directement au cerveau (220, 221).

Les effets neuroprotecteurs du CNTF sont aussi observés sur les cellules de la rétine. CNTF induit la régénération du segment externe du cône dans un modèle de dégénération de la rétine chez le rat (222). En plus, CNTF induit la survie et la différenciation des cellules progénitrices rétinienne neurales humaines (223). Plusieurs modèles de dégénération de la rétine suggèrent que le CNTF pourrait être utilisé comme un agent trophique pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (MDA). L'utilisation des implants de cellules (NT-501) de l'épithélium pigmentaire rétinien, modifiés génétiquement pour permettre la sécrétion du CNTF dans l'humeur vitrée, est approuvée cliniquement pour cette pathologie (224, 225).

### **3.7.2.2. Effets métaboliques**

Des études ont démontré que l'injection péritonéale du CNTF à des souris ob/ob active le centre de la satiété hypothalamique d'une manière indépendante de la leptine et réduit le risque de l'obésité et du diabète associé au surpoids et à la résistance à la leptine (226). De plus, le CNTF régule directement le métabolisme des adipocytes en induisant l'activation de la voie STAT3 des adipocytes 3T3-L1 en culture et des adipocytes primaires (227). D'autre part, le CNTF induit l'expression du transporteur d'insuline (GLUT4) et du récepteur de l'insuline (IRS-1) sur les cellules musculaires. Au niveau des tissus adipeux bruns, CNTF induit l'expression d'UCP-1, nécessaire pour la production de la chaleur et de l'ATP (228). L'injection du CNTF humain (axokine) en phase II clinique induit une perte significative du poids chez les sujets obèses. Par contre, l'apparition des effets secondaires et le développement des anticorps qui neutralisent l'effet du CNTF a réduit l'efficacité du traitement en phase clinique III (229).

## 4. Les lipoprotéines

### 4.1. Vue globale

Les lipoprotéines représentent une vaste famille de particules globulaires de haute masse moléculaire. Ils forment une sphère constituée de cholestérol estérifié et de triglycérides centraux enveloppés par une membrane formée d'une monocouche amphiphile composée de phospholipides et de cholestérol libre non estérifié (figure 18). Pour être transportées à travers le plasma (milieu aqueux), les lipoprotéines doivent se complexer à des protéines plasmatiques appelées apolipoprotéines (230). Les apolipoprotéines servent à la reconnaissance des lipoprotéines par des récepteurs et des enzymes ce qui détermine la fonction et le destin métabolique de la particule (231). À travers leurs passages dans la circulation sanguine, les lipoprotéines subissent des modifications complexes qui affectent leur structure, leur composition, et leur fonction. Arrivées à destination, les lipoprotéines sont captées par des récepteurs spécifiques et utilisées par la cellule pour la production d'énergie (232) et la fabrication de différentes substances endogènes, telles que les hormones stéroïdiennes (233). Les lipoprotéines peuvent donc être divisées selon leurs propriétés physiques (taille et densité), mais aussi selon leur composition en lipides et protéines et selon leur fonction (234).

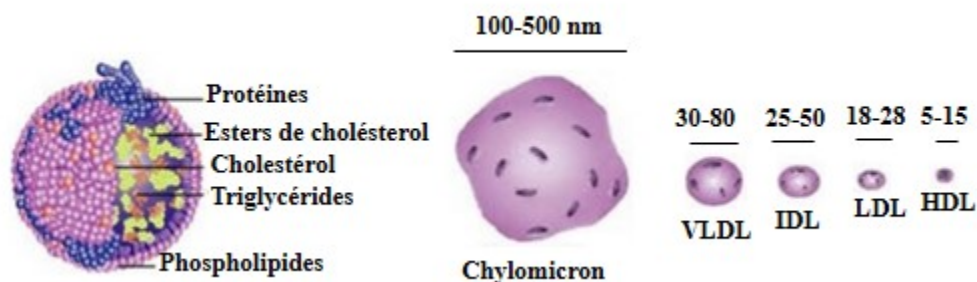


Figure 18. **La composition et la taille de différentes lipoprotéines**

À gauche, les lipoprotéines forment une sphère constituée d'esters de cholestérol et des triglycérides enveloppés par une membrane formée d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol libre non estérifié. À droite, un dessin indiquant la taille de différentes lipoprotéines allant de 100 à 500 nm pour les chylomicron jusqu'au 5 à 15 nm pour les HDL.

## **4.2. Classification des lipoprotéines**

### **4.2.1. Les chylomicrons (CM)**

Les CM sont synthétisés par les entérocytes (cellules intestinales) sous forme de CM natifs qui sont relâchés par la suite dans la circulation lymphatique puis dans le sang. L'apolipoprotéine B-48 est présente en une seule copie et est nécessaire à l'assemblage intracellulaire et à la sécrétion de la particule. Les CM sont responsables du transport des lipides alimentaires à partir des intestins vers les tissus périphériques et le foie. Une fois dans la circulation sanguine, les CM acquièrent de l'apoE qui leur permet de se lier au récepteur du LDL (LDLR) ou à la protéine reliée au récepteur du LDL (LRP) au niveau du foie (235).

La lipoprotéine-lipase plasmatique LPL, activée par l'apoC venant des HDL, induit la réduction des CM. Les triglycérides sont donc séparés en glycérol et acides gras et on obtient des résidus de CM. Ces acides gras se fixent à l'albumine et sont ainsi absorbés par les cellules hépatiques et par les tissus périphériques (236). Une particule de CM contient de l'apoA-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III et E.

### **4.2.2. Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL)**

Les VLDL sont synthétisées et sécrétées par les cellules hépatiques à partir des triglycérides endogènes qui en sont le principal constituant, et des apolipoprotéines, principalement l'apoB-100. La synthèse des VLDL augmente beaucoup après les repas et revient à son niveau de base à jeun. Les VLDL contribuent à la voie endogène des lipoprotéines, soit du foie vers les tissus périphériques. L'apoB-100 est important pour l'assemblage et l'intégrité structurelle du VLDL (237).

Les VLDL sont dégradées plus lentement que les CM par l'action de la lipoprotéine-lipase activée par l'apoprotéine C-II. La population de particules VLDL est hétérogène pour ce qui concerne la composition et la fonction. Par exemple, la proportion des apolipoprotéines peut varier d'une particule à l'autre. La composition du VLDL change à partir de sa production jusqu'à sa conversion en IDL à chaque fois que les lipases viennent hydrolyser les triglycérides

pour être utilisées par les cellules (238, 239). La fraction protéique du VLDL est composée d'apoB-100, E, C-I, C-II et C-III (240).

Les VLDL jouent un rôle dans la régulation de l'angiogenèse des vaisseaux sanguins au niveau de la rétine (241). Les photorécepteurs sont des cellules riches en mitochondries et consomment beaucoup d'énergie. Une insuffisance dans la production énergétique suite à un dysfonctionnement des mitochondries cause une angiogenèse et une néovascularisation de la macula de la rétine qui impliquent le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire "VEGFA". En effet, le glucose est la source majeure de l'énergie. Par contre, les souris déficientes en transporteur de glucose glut4 présentent une bonne vision ce qui suggère la présence d'une autre voie alternative médiée par la  $\beta$ -oxydation des lipides. Contrairement à la déficience en glut4, les souris VLDLR<sup>-/-</sup> développent des lésions rétinienne vasculaires, de plus la déficience en VLDLR induit une maculopathie chez l'humain. Les VLDL constituent donc une source importante d'énergie. Une mauvaise régulation du transport des lipides cause une formation des néo vaisseaux (241).

#### **4.2.3. Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)**

Les IDL sont produites suite à l'hydrolyse des VLDL par les lipases. Elles se caractérisent par un aspect pro-athérogénique. En raison de la taille des IDL qui est réduite par rapport aux VLDL, les apoC perdent leur affinité avec la particule et sont alors échangées aux CM, VLDL, et aux HDL. Par ailleurs, une molécule d'apoB-100 est toujours présente à la surface de chaque IDL, de même que plusieurs molécules d'apoE (242).

#### **4.2.4. Les lipoprotéines de faible densité (LDL)**

Les LDL sont issues des IDL et VLDL. Par l'action des lipases, les VLDL originales perdent la majorité des triglycérides et se retrouvent enrichies en cholestérol estérifié (LDL). Elles constituent la dernière classe des lipoprotéines contenant l'apoB-100 essentiel à l'intégrité structurelle de la particule. Les LDL transportent la majorité du cholestérol dans la circulation. Une abondance des LDL est associée à une hyperglycémie, un niveau bas des HDL, une obésité, un diabète type 2 ainsi qu'une situation pro-inflammatoire. Les petites particules des LDL sont

plus athérogéniques que les particules larges pour plusieurs raisons. Par exemple, les petites particules présentent moins d'affinité vers le récepteur du LDL et passent un temps plus grand dans la circulation. En plus, elles rentrent facilement à travers la paroi artérielle et sont susceptibles à une oxydation facilitant leur phagocytose en présence des macrophages (243-245).

#### **4.2.5. Les lipoprotéines de haute densité (HDL)**

Les HDL sont synthétisées principalement par les entérocytes et les hépatocytes à partir d'hydrolyse des CM et VLDL riches en triglycérides. Le rôle des HDL est complexe, l'une des fonctions majeures est de transporter les lipides vers la voie de dégradation. Généralement, une concentration élevée des HDL est associée à une diminution du risque d'athérosclérose dans les artères et une diminution de l'incidence des maladies cardiaques (246). Par ailleurs, les souris déficientes en HDL ont toujours la possibilité de transporter le cholestérol vers la bile ce qui suggère la présence d'une voie alternative pour éliminer l'excès du cholestérol (247). Les particules HDL contribuent également au transport des micro-ARN et à l'expression systémique des gènes (248). Au niveau du système immunitaire, les HDL présentent des propriétés anti-inflammatoires. Par exemple, elles induisent l'inhibition de l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales en diminuant l'expression des molécules d'adhésion (249). En plus de leur rôle anti-athérogénique, les particules HDL ont des propriétés antioxydantes, anti-thrombotiques et anti-apoptotiques (250).

### **4.3. Les récepteurs aux lipoprotéines**

#### **4.3.1. La famille des récepteurs des LDL (LDLR)**

La famille des récepteurs des LDL (LDLR) est composée des glycoprotéines transmembranaires qui sont souvent reconnues comme des récepteurs endocytiques favorisant l'internalisation des ligands extracellulaires et leur dégradation via les lysosomes. Elles comprennent au moins 10 membres : LDLR lui-même, le récepteur 2 d'apolipoprotéine E (apoER2), VLDLR, LRP, LRP1B, mégalin, LRP3, LRP4, LRP5 et LRP6 (figure 19) (251).



Ces récepteurs se caractérisent par la présence des domaines répétés dans la région extracellulaire qui sont riches en cystéines et qui comprennent des sites de fixation du ligand qui présente une spécificité pour chaque membre de LDLR, des domaines répétés homologues au précurseur de l'EGF qui contiennent aussi six cystéines dans chaque domaine et une région conservée YWTD qui donne une conformation  $\beta$  à la molécule. Les domaines homologues au précurseur de l'EGF et les répétitions YWTD sont impliqués dans la dissociation entre le ligand et le récepteur. La partie intracellulaire comporte une queue cytoplasmique relativement courte qui induit le signal d'endocytose (252, 253). L'interaction des ligands avec la famille des récepteurs des LDL est inhibée en présence d'une protéine apparentée au récepteur (RAP) qui joue le rôle d'une molécule chaperonne à l'intérieur de la cellule facilitant le pliage du récepteur et prévenant ainsi sa liaison avec les ligands (254).

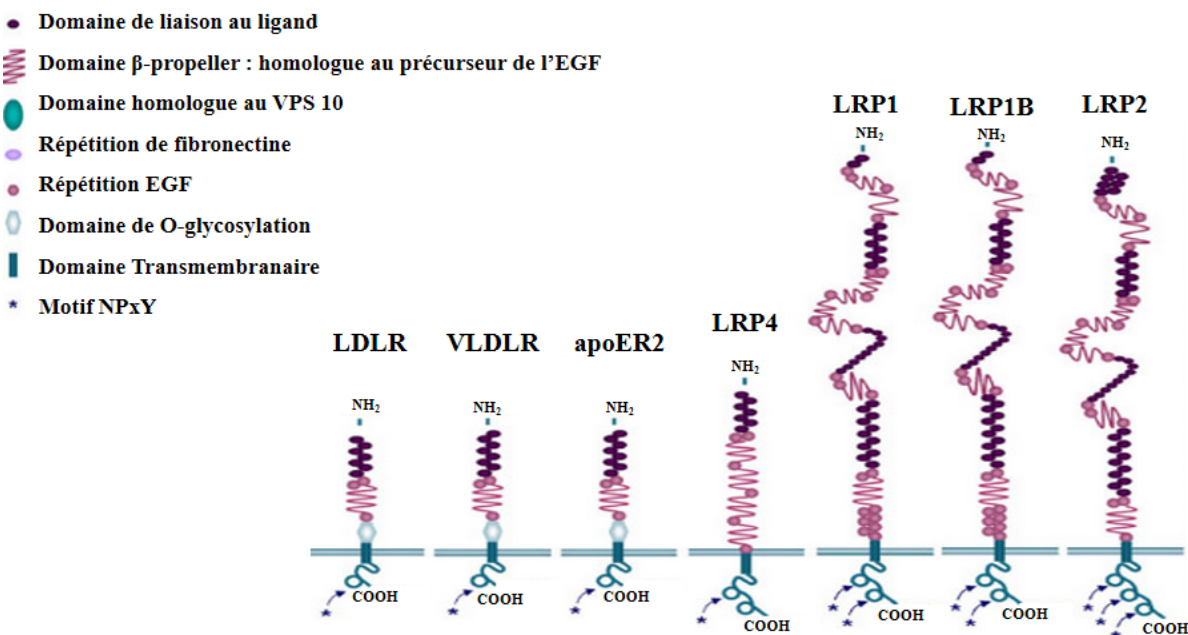


Figure 19. **Structure des récepteurs des LDL**

La famille des récepteurs des LDL est composée de plusieurs domaines répétés dans la région extracellulaire. Ces domaines sont impliqués dans la conformation du récepteur, la reconnaissance et la fixation du ligand ainsi que sa dissociation. La partie intracellulaire comporte une queue cytoplasmique qui induit le signal d'endocytose.

Le récepteur du LDL (LDLR) est exprimé principalement par les cellules hépatiques (255). En effet, le LDLR reconnaît l'apoB100 et l'apoE et contribue donc à l'endocytose du LDL, chylomicron restant et IDL. Après l'internalisation, la particule de la lipoprotéine est ensuite dégradée induisant la relâche du cholestérol ce qui diminue l'activité du HMDCoA réductase responsable de la biosynthèse du cholestérol et aussi l'expression du LDLR. L'expression du LDLR au niveau du foie détermine le niveau plasmatique des LDL. En effet, l'expression du LDLR est inversement contrôlée par le taux du cholestérol dans la cellule. Les protéines reliées à la LDL ou LRP constituent un autre récepteur de la LDL qui reconnaît l'apoE et contribue à l'internalisation des chylomicrons et IDL (256).

Les VLDLR sont exprimés par les cellules cardiaques, les adipocytes, les cellules musculaires, les macrophages, les cellules endothéliales, la rétine et le cerveau (257). Les triglycérides constituent les premiers ligands du VLDLR. Contrairement au LDLR, les VLDLR reconnaissent l'apoE mais pas l'ApoB100 (258). L'affinité du VLDLR vers l'apoE est moins forte que celle du LDLR. De plus, VLDLR ne nécessite pas la présence des lipides et donc peut lier les formes libres d'apoE (259). Les VLDLR sont impliquées dans le métabolisme des triglycérides ainsi que des fonctions neuronales (260).

#### **4.3.2. Le récepteur "scavenger" des HDL : SR-B1**

Le criblage d'une banque d'ADNc exprimée dans les cellules CHO déficientes en récepteurs des LDL a permis l'identification du SR-B1, un récepteur qui fait partie de la famille des récepteurs "scavenger" classe B. SR-B1 est exprimé au niveau des hépatocytes favorisant l'absorption du cholestérol et aussi au niveau des macrophages facilitant cette fois-ci l'efflux du cholestérol vers les particules HDL (261).

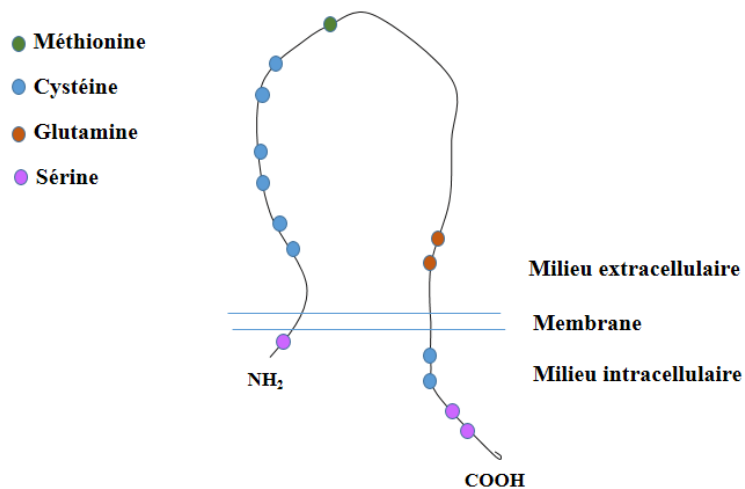


Figure 20. **Structure de SR-B1, récepteur des HDL**

Le récepteur SR-B1 est une glycoprotéine membranaire dont les extrémités N et C terminales sont intracytoplasmiques. La partie extracellulaire comprend six résidus de cystéines impliqués dans la formation des ponts disulfures. La partie intracellulaire possède trois résidus sérines qui sont phosphorylés lors de l'induction du signal et deux sites de palmitoylation impliqués dans la régulation de la cascade de transduction du signal. Les résidus de glutamine et méthionine sont impliqués dans l'interaction entre SR-B1 et les lipoprotéines. La partie C terminale facilite l'internalisation du cholestérol estérifié à l'intérieur des cellules, tandis que la partie N terminale est responsable du ciblage correct du ligand vers le récepteur (262).

## 5. Les apolipoprotéines

### 5.1. Vue générale

Les apolipoprotéines sont des protéines qui se lient aux lipides formant ainsi des lipoprotéines. Elles jouent un rôle important dans l'activation des enzymes responsables du transport, de la synthèse et du catabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Le taux des apolipoprotéines varie en fonction de : sexe, âge, race, style de vie, stress, exercice, alcool et drogues (263). On distingue entre quatre classes d'apolipoprotéine : apoA, apoB, apoC et apoE.

L'apoA comprend deux isoformes, apoA-1 et apoA-2. L'apoA est la protéine majeure qui forme la particule HDL, mais qu'on trouve également, mais rarement au niveau des CM et VLDL. Un taux élevé des deux lipoprotéines est associé avec un risque plus faible de maladie athéromateuse artérielle coronaire (264).

L'apoB est un constituant principal des LDL, VLDL, et des chylomicrons. Il existe deux formes d'apoB dans le plasma, apoB100 et apoB48. La lipoprotéine apoB-100 est retrouvée au niveau des LDL et VLDL et est synthétisée principalement par le foie. L'apoB-100 intervient dans l'assemblage des triglycérides et cholestérols vers la structure VLDL et est responsable, de la reconnaissance et le catabolisme des LDL. Un taux élevé d'apoB est associé à un risque plus élevé des maladies cardiovasculaires (265)

L'apoC comprend trois isoformes, apoC-1, apoC-2 et apoC-3. ApoC-2 active la lipoprotéine lipase qui hydrolyse les triglycérides contenus dans les chylomicrons et les VLDL tandis que l'apoC-3 inhibe l'activité de cette même enzyme ce qui empêche l'absorption hépatique des chylomicrons et VLDL. Les patients déficients en ApoC-2 présentent une hypertriglycéridémie sévère (266).

## **5.2. L'apolipoprotéine E (apoE)**

### **5.2.1. Identification et profil d'expression**

L'apoE est une glycoprotéine ubiquitaire de 35KDa localisée principalement au niveau des résidus de chylomicrons, VLDL et une sous-classe des HDL. L'apoE interagit avec les membres de récepteurs appartenant à la famille des récepteurs des LDL afin de moduler le niveau des lipoprotéines plasmatiques et du cholestérol. La source majeure de l'apoE plasmatique est le foie. Le deuxième site de production de l'apoE est le cerveau où l'apoE est synthétisé principalement par les oligodendrocytes, la microglie et les astrocytes. Des quantités importantes d'ARNm d'apoE sont aussi observées au niveau des poumons, des reins, et des ovaires (267). La stimulation des macrophages par des cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF et TNF- $\alpha$ ) réduit la production d'apoE tandis que les cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ ) augmentent sa sécrétion (268). L'expression d'apoE par différents tissus suggère que de plus de son rôle dans le métabolisme des lipides et les maladies cardiovasculaires, l'apoE pourrait avoir des effets dans le système immunitaire, le bon fonctionnement du cerveau et les désordres neurodégénératifs (269).

### **5.2.2. Structure de l'apoE**

Comme les apolipoprotéines solubles, l'apoE se caractérise par la présence d'une hélice  $\alpha$ -amphipathique essentielle pour la stabilité des lipoprotéines. Les deux côtés hydrophilyque et hydrophobique permettent l'échange entre une forme associée aux lipides et une forme libre de l'apoE. La structure secondaire de l'apoE indique la présence de deux domaines fonctionnels liés par une boucle flexible sensible aux protéases. Le domaine N-terminal est composé de quatre hélices  $\alpha$ -amphiphiles arrangées d'une façon antiparallèle et un domaine riche en acides aminés basiques qui représente un site de fixation à l'héparine et de liaison avec les récepteurs des LDL (270). Le domaine C-terminal est riche en hélices  $\alpha$  (271), il facilite la liaison et le transport des lipides grâce à un site de liaison aux lipides. De plus, il a une stabilité inférieure, mais une conformation plus flexible que le fragment N-terminal et confère à l'apoE le potentiel de former des multimères (tétramères). L'association des lipides avec l'apoE induit un changement

conformationnel de l'apoE qui augmente son affinité vis-à-vis les récepteurs des LDL par rapport à la forme libre (272). Bien que les deux domaines (N-terminal et C-terminal) soient indépendants, chacun peut influencer les propriétés de l'autre.

### **5.2.3. Polymorphisme de l'apoE**

L'apoE humain existe sous trois isoformes principales E2, E3 et E4 qui se distinguent par une substitution d'un ou deux acides aminés au niveau du gène codant pour l'apoE et qui entraîne différents caractères biologiques. En revanche, un seul allèle est présent chez la souris, et est structurellement semblable à l'allèle apoE4 humain. En effet, l'apoE3 contient une cystéine à la position 112 et une arginine à la position 158, l'apoE2 contient une cystéine à la position 112 et 158 alors que l'apoE4 contient une arginine dans les deux sites (figure 21) (273).

Les différentes isoformes d'apoE ont des structures et fonctions distinctes au niveau moléculaire et cellulaire et sont associées à des conditions neuropathologiques. Le polymorphisme d'apoE influence également l'interaction avec les récepteurs aux lipoprotéines ainsi que la distribution des lipoprotéines plasmatiques. Par exemple, l'apoE4 présente une affinité plus élevée sur les VLDL tandis que l'apoE3 et l'apoE2 s'associent préférentiellement aux phospholipides riches en HDL (274, 275). Généralement, l'apoE des VLDL et chylomicrons se lie à la famille des récepteurs des LDL au niveau du foie. Les sujets porteurs des allèles E3 et E4 présentent une affinité plus forte à ces récepteurs relativement à l'allèle E2 et donc se caractérisent par une clairance plus rapide des lipoprotéines plasmatiques (276).

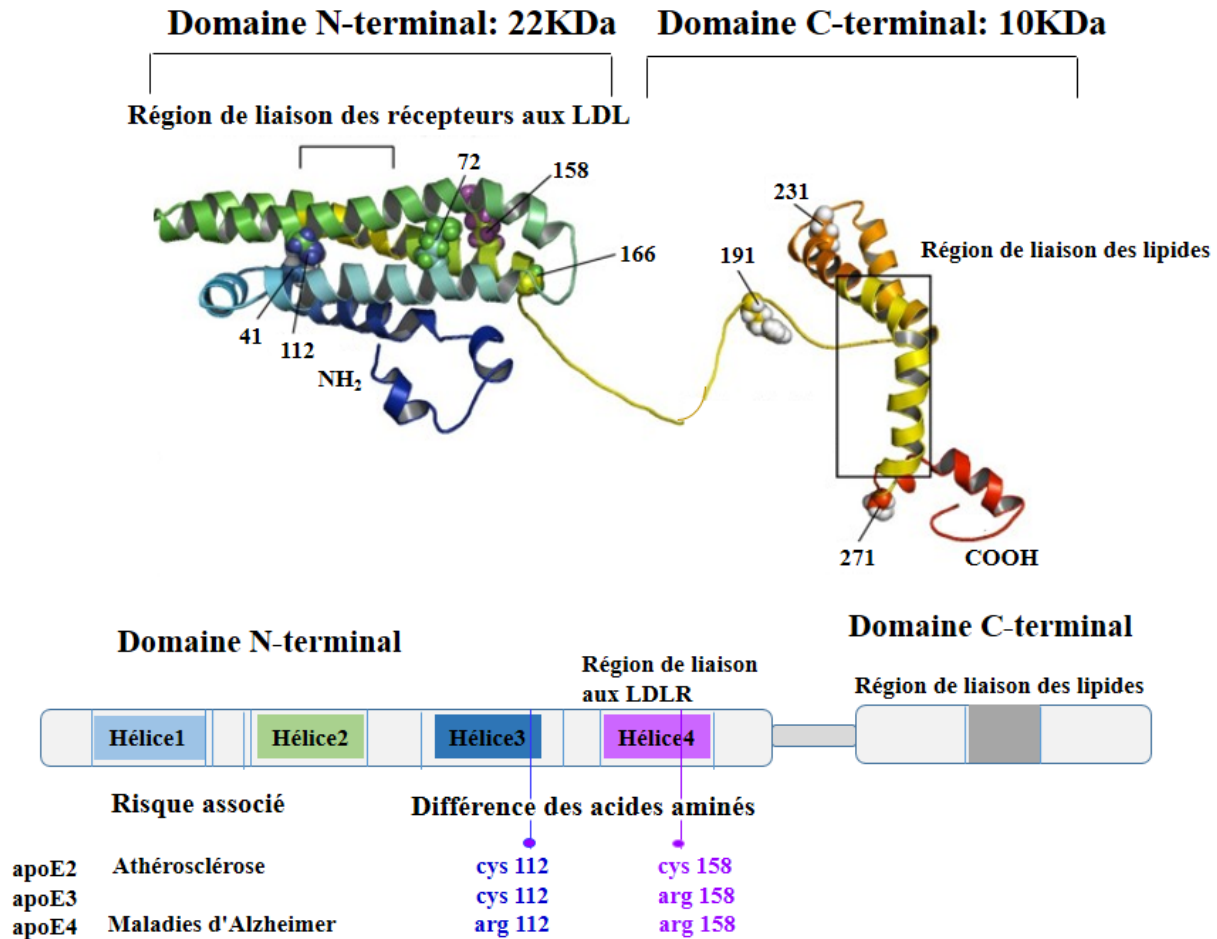


Figure 21. Structure et polymorphisme de l'apoE

Le domaine N-terminal de l'apoE comprend quatre hélices- $\alpha$  amphiphiles arrangées d'une façon antiparallèle et un domaine riche en acides aminés contient une région de liaison avec les récepteurs des LDL. Le domaine C-terminal joue un rôle majeur dans le transport des lipides, grâce à un site de liaison aux lipides. La partie située entre ces deux domaines fonctionnels est une région de structure non ordonnée. Les isoformes d'apoE diffèrent d'une ou deux acides aminés, soit l'arginine ou la cystéine dans les positions 112 et 158. L'allèle E4 est connu comme étant le principal facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer tandis que l'allèle E3 est associé au développement de la maladie d'athérosclérose.

## **5.2.4. Les récepteurs de l'apoE**

Les récepteurs d'apoE font partie des récepteurs des LDL et incluent le récepteur du LDL lui-même, apoER2, VLDLR, et LRP1 (277). Ces récepteurs influencent les effets de l'apoE au niveau du système nerveux central ainsi que le métabolisme et la toxicité de l'amyloïde- $\beta$ . Certains de ces récepteurs comme LDLR et LRP1 contrôlent le niveau d'apoE et sont importants dans la régulation des fonctions neurologiques dans le CNS (278), d'autres comme apoER2 et VLDLR peuvent être aussi des récepteurs pour d'autres ligands comme la reeline, une protéine qui se trouve principalement dans le cerveau où elle exerce un rôle dans le développement précoce du cerveau et également dans la plasticité synaptique dans le cerveau adulte (279). En plus de l'apoE, le LRP1 pourrait aussi lier la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et la  $\beta$ -amyloïde et influencer par conséquent leur métabolisme dans le cerveau (280). Par ailleurs, le knock-out conditionnel de LRP1 et la déficience dans l'expression du LRP1 exclusivement dans les neurones post mitotique induit une anomalie locomotrice sévère chez la souris (281).

## **5.2.5. Les différentes fonctions de l'apoE**

### **5.2.5.1. Le transport du cholestérol et l'athérosclérose**

Parmi les apolipoprotéines qui participent à l'homéostasie du cholestérol, on retrouve l'apoE. En effet, l'interaction de l'apoE présent au niveau des VLDL et des chylomicrons ainsi que leurs résidus avec la famille des récepteurs des LDL induit la clairance hépatique du cholestérol, mais participe également au transport du cholestérol vers le sens inverse. L'apoE joue également un rôle protecteur dans l'athérosclérose par l'intermédiaire des multiples propriétés anti-inflammatoires exercées sur différentes cellules de la membrane vasculaire. Les macrophages sont la principale source des apoE dans la membrane vasculaire qui contribuent à la diminution de l'incidence de l'athérosclérose (282). D'autres mécanismes s'ajoutent : l'apoE réduit l'oxydation des lipides et l'activation des cellules endothéliales (283) et les plaquettes (284), la clairance phagocytaire des corps apoptotiques (285) et la suppression de la migration et de la prolifération des cellules vasculaires des muscles lisses via l'interaction avec l'héparine présente sur la matrice des membranes artérielles (286).



Par ailleurs, le polymorphisme d'apoE influence le risque de la maladie athéromateuse en raison de la différence de l'affinité envers les récepteurs des LDL. Les souris apoE<sup>-/-</sup> se caractérisent par une hyperlipidémie et un développement des lésions athérosclérotiques. Seul l'allèle E2 est associé à un niveau plus faible du LDL comparativement aux allèles E3 et E4, et exerce un rôle protecteur contre la progression de l'athérosclérose. Par ailleurs, l'allèle E4 augmente le niveau du LDL plasmatique et présente un risque plus élevé d'athérosclérose par rapport à l'allèle E3 chez les patients atteints d'une hyperlipidémie et des maladies cardiovasculaires (273) (287).

### **5.2.5.2. Les propriétés neurologiques de l'apoE**

L'apoE est exprimé au niveau du cerveau principalement par les astrocytes et les microglies et sous certaines conditions par les neurones. L'apoE constitue un facteur de risque majeur dans la maladie d'Alzheimer et joue également un rôle potentiel dans d'autres maladies neurologiques (288).

La maladie d'Alzheimer se caractérise par une accumulation extracellulaire de l'amyloïde-A $\beta$  qui passe d'une forme monomérique non toxique vers une forme oligomérique toxique accompagnée d'une atrophie cérébrale et d'une inflammation. Le dépôt de l'amyloïde-A $\beta$  est due au dysfonctionnement de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) qui subit plusieurs clivages par des sécrétases et donne lieu à différents peptides qui sont à l'origine de la formation des plaques amyloïdes (289).

Le rôle de l'apoE dans le développement de la maladie d'Alzheimer est médié par deux différentes voies soit dépendamment ou d'une manière indépendante de l'amyloïde-A $\beta$ . L'apoE est présent au niveau des plaques amyloïdes chez les patients atteints de l'Alzheimer, il influence l'accumulation de ces plaques et la formation de la forme toxique. Les deux formes d'apoE, soit libre ou associée aux lipides, peuvent interagir avec les plaques amyloïdes via les résidus C-terminaux. En effet, le rôle de l'apoE dans le cerveau est de transporter le cholestérol vers les neurones à travers le récepteur de l'apoE (apoER) et réduire l'accumulation des lipides en favorisant leur clairance. Cet effet est affecté par le polymorphisme de l'apoE avec une clairance plus rapide en présence de l'allèle 4. De la même façon, l'interaction de l'apoE avec les plaques

amyloïdes influence leur clairance à travers le récepteur d'apoE (apoR2). En raison de la différence de l'affinité de différentes isoformes pour l'amyloïde- $\beta$ , la clairance des plaques amyloïdes semble être beaucoup plus faible en présence d'apoE4, suivis de l'apoE3 et apoE2 ce qui pourrait expliquer le fait que l'apoE4 soit un facteur de risque majeur dans la maladie d'Alzheimer (290). L'apoE peut également être associé à la maladie d'Alzheimer à travers un autre mécanisme qui n'implique pas l'amyloïde- $\beta$ . L'activation des microglies chez les souris apoE transgéniques par le LPS induit une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires en fonction de différentes isoformes avec un risque plus élevé en présence d'apoE4.

#### **5.2.5.3. L'apoE et la pathologie du FSGS**

En plus de son rôle dans le maintien de l'homéostasie lipidique, l'apoE exerce une fonction importante dans la protection rénale. Le syndrome néphrotique se caractérise par une forte concentration d'apoE dans le sérum et l'urine des patients. En effet, l'apoE contrôle la prolifération des cellules mésangiales et l'expansion de la matrice cellulaire. Les souris déficientes en apoE développent à la fois l'athérosclérose et les lésions rénales qui ressemblent à la maladie du FSGS. Des études montrent l'association du FSGS avec les deux allèles E2 et E4 chez les patients. Par ailleurs, les souris E2 homozygotes développent une hypercholestérolémie et un dommage progressif du glomérule rénal caractérisé par une accumulation anormale des lipoprotéines et des cellules spumeuses. Des traitements hypolipémiants réduisent la protéinémie associée à cette maladie (291).

#### **5.2.5.4. Les réponses immunoregulateurs**

L'apoE joue un rôle immunomodulateur qui se caractérise par la suppression des cytokines pro-inflammatoires en fonction des isoformes avec un effet régulateur plus élevé en présence d'apoE2 comparativement à l'apoE3 et l'apoE4. Dans ce contexte, l'apoE est impliquée dans l'inhibition de l'activation des neutrophiles, la régulation de l'immunité innée et la susceptibilité à l'infection bactérienne (292), la neutralisation des effets du LPS, la suppression de la prolifération des cellules T à travers la réduction de la réponse d'IL-2 (293), et l'inhibition de leur activation en minimisant la densité du CMH classe II et l'expression des facteurs costimulateurs sur les macrophages (294). En outre, l'apoE joue également un rôle

dans le maintien de la balance Th1/Th2 en inhibant la différenciation des cellules Th1 en induisant la différenciation de type Th2 (295). Une hypercholestérolémie sévère induit également le changement de la réponse des cellules T et influence la polarisation des cellules Th1 chez les souris apoE<sup>-/-</sup>. Les souris apoE<sup>-/-</sup> se caractérisent par une sécrétion d'IL-17 et IL-6, une induction d'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$  et une diminution du nombre des cellules T régulatrices (296, 297).

D'autre part, l'expression de l'apoE par les macrophages est modulée par différentes cytokines inflammatoires, par exemple, elle est plus élevée en présence du TNF $\alpha$  (298) alors que l'INF- $\gamma$  la réduit (299). La diversité des cytokines générée par les cellules de la membrane vasculaire peut donc avoir un impact sur le niveau d'apoE ainsi que son potentiel protecteur dans l'athérosclérose. En effet, l'apoE inhibe la polarisation des macrophages M1 des macrophages et induit la polarisation des macrophages M2 qui se caractérisent par une sécrétion des cytokines anti-inflammatoires (300) à travers la liaison avec les VLDLR et apoER2 exprimées à la surface des macrophages. En revanche, la stimulation des macrophages par l'apoE augmente la synthèse du monoxyde d'azote (301-303), une des principales caractéristiques de l'activation des macrophages avec un effet plus accentué en présence de l'allèle 4 d'apoE. L'apoE4 semble donc associé à un dysfonctionnement de l'immunorégulation.

L'apoE semble avoir un rôle régulateur dans certaines maladies auto-immunes. Le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) de la sclérose en plaques se caractérise par des lésions neuronales accompagnées d'une inflammation aiguë. L'apoE joue un rôle anti-inflammatoire important dans cette maladie. La concentration plasmatique d'apoE est élevée chez les souris EAE. L'induction de la maladie chez les souris déficientes en apoE (modèle EAE/apoE<sup>-/-</sup>) induit une exacerbation de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique ce qui aboutit à une neurodégénération, et une polarisation des cellules pro-inflammatoires Th1 et Th17 au niveau de la rate et le cerveau. Un peptide dérivé de l'apoE appelé cog133 atténue la sévérité de la maladie en inhibant la production des cytokines et des radicaux libres et la diminution de la prolifération des cellules T (304).

### 5.2.5.5. La liaison de l'apoE avec les cytokines : exemple du complexe CNTF/ApoE

L'apoE contient un domaine composé de quatre  $\alpha$ -hélices semblables aux cytokines et aux facteurs de croissance incluant le CNTF. CNTF est sécrété en présence des lésions qui attaquent le système nerveux central afin d'assurer la régénérescence des cellules neuronales. En plus de son rôle dans le transport des lipides et la survie des neurones, l'apoE est une protéine accessoire qui interagit avec le CNTF et potentialise son activité biologique. En effet, il a été observé que le CNTF forme un complexe avec les trois isoformes d'apoE. Le CNTF interagit avec l'apoE présente dans le fluide cérébrospinal humain des individus homozygotes pour l'allèle E3 et E4 de l'apoE. Le CNTF supporte la survie des neurones de l'hippocampe du rat et cette activité semble être améliorée en présence d'apoE3 et apoE4 (1). Une nouvelle fonction neurologique de l'apoE serait donc de faciliter la réparation neuronale en favorisant l'activité de certains facteurs de croissances, en particulier, le CNTF.

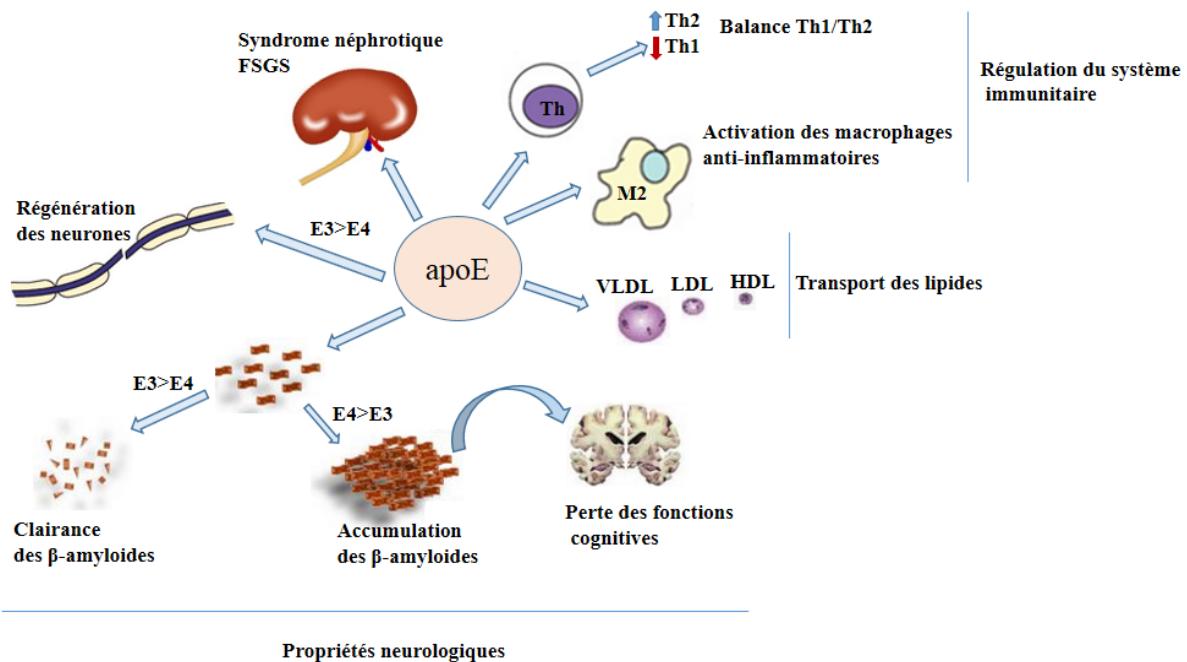


Figure 22. Représentation des différents rôles de l'apoE

Le rôle principal de l'apoE est le transport des lipides. L'apoE exerce aussi un rôle important dans la fonction rénale et protège contre le développement du syndrome néphrotique FSGS. L'allèle E3 a des propriétés neuro-modulatrices et semble être impliqué dans la régénération des neurones et la clairance de la  $\beta$ -amyloïde tandis que l'allèle E4 constitue un risque majeur de la maladie d'Alzheimer. L'apoE joue aussi un rôle dans la modulation du système immunitaire en induisant l'activation des macrophages anti-inflammatoires de type M2 ainsi que le maintien de la balance Th1/Th2.

## Chapitre II : Objectifs et hypothèses de travail

Dans la famille IL-6/IL-12 des cytokines, il existe de nombreuses redondances dans l'utilisation des sous-unités formant ces cytokines. Ces cytokines peuvent également activer des récepteurs partageants des chaînes communes sans forcément induire les mêmes effets biologiques. L'utilisation des souris déficientes pour une sous-unité ou une chaîne de récepteur pose donc plusieurs questions vis-à-vis la spécificité de la réponse immunitaire. La compréhension complète de différentes interactions qui caractérisent cette famille n'a pas encore été clairement investiguée. L'objectif général de la thèse est d'établir de nouvelles interactions aux cytokines qui pourront changer leurs fonctions biologiques. Ceci pourrait donc aider à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées sans pour autant affecter l'immunité des patients.

Premièrement, nous nous sommes intéressés à étudier les effets du récepteur soluble EB13 qui fait partie des deux cytokines composites IL-27 (EB13/p28) et IL-35 (EB13/p35). Étant donné que la liaison entre le récepteur soluble EB13 et les deux sous-unités est une liaison non covalente, nous avons émis l'hypothèse que l'administration d'EB13 ou de dérivé d'EB13 tel que des chimères EB13-Fc pourrait favoriser la formation de ces cytokines *in vivo* et être utilisée en immunothérapie. Toutefois, cette stratégie pourrait être compliquée par des activités biologiques observées de l'EB13 *in vitro* indépendantes de ces cytokines.

Deuxièmement, nous avons évalué l'existence de nouveaux partenaires de la cytokine CLCF1. CLCF1 induit des effets neurotrophiques similaires au CNTF à travers un récepteur contenant la chaîne CNTFR $\alpha$ , une chaîne qui n'est pas exprimée par les cellules immunitaires. Par ailleurs, le récepteur impliqué dans les effets immunitaires du CLCF1 n'a pas encore été identifié. Nous avons donc été intéressés à examiner la possibilité de formation de nouvelles interactions avec CLCF1 qui pourront probablement expliquer les mécanismes de la régulation du système immunitaire par CLCF1. La structure du CLCF1 comporte quatre hélices- $\alpha$  qui ressemble à la structure du domaine amino-terminal de l'apolipoprotéine E. Partant du fait que CLCF1 peut se retrouver sous une forme homodimère, nous avons évalué la formation d'un

complexe hétérodimère entre CLCF1 et apoE. Étant donné que le rôle majeur de l'apoE est le transport des lipides, ceci pourrait suggérer un nouveau lien entre les cytokines, CLCF1 en particulier, et les différentes fractions lipidiques.

## Chapitre III : Article 1

### Epstein-Barr Virus-Induced Gene 3 (EBI3) Can Mediate IL-6 Trans-Signaling

Salma Chehboun<sup>‡</sup>, Jérémie Labrecque-Carbonneau<sup>♠</sup>, Sarah Pasquin<sup>‡</sup>, Yasmine Meliani<sup>‡</sup>, Bouchra Meddah<sup>§</sup>, Walter Ferlin<sup>¶</sup>, Mukut Sharma<sup>#</sup>, Aurélie Tormo<sup>‡</sup>, Jean-François Masson<sup>♠</sup> and Jean-François Gauchat<sup>‡1</sup>

*From the <sup>‡</sup>Département de Pharmacologie, and <sup>♠</sup>Département de Chimie, Université de Montréal, QC, H3T 1J4, <sup>§</sup>Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V, Rabat, Morocco, <sup>¶</sup>NovImmune, 1228-Plan-les-Ouates, Switzerland, and the <sup>#</sup>Research Service, KCVA Medical Center and Midwest Biomedical Research Foundation, Kansas City, MO 64128- 2226, USA*

**Running title** : EBI3 and IL-6 trans-signaling

To whom correspondence should be addressed: Dr Jean-François Gauchat, Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Pavillon Roger Gaudry S455/N424, 2900 Édouard Montpetit, Montreal QC, H3T 1J4 Canada. Tel.: 514 343 6111. E-mail: jf.gauchat@umontreal.ca.

**Keywords** : cytokines, endothelial cells, inflammation, interleukin 6 (IL-6), interleukin 6 receptor (IL-6R)

*Manuscript submitted to "Journal of Biological Chemistry"*



## ABSTRACT

EBI3 is a subunit of the composite cytokines IL-27 and IL-35. Both have beneficial functions or effects in models of infectious and autoimmune diseases. This suggests that administration of EBI3 could be therapeutically useful by binding free p28 and p35 to generate IL-27 and IL-35. IL-27- and IL-35-independent functions of EBI3 could compromise its therapeutic uses. We therefore assessed the effects of EBI3 on cytokine receptor expressing cells. We observed that EBI3 activates STAT3 and induces the proliferation of the IL-6-dependent B9 mouse plasmacytoma cell line. Analyses using blocking mAbs and Ba/F3 transfectants expressing gp130 indicate that EBI3 activity was linked to its capacity to mediate IL-6 trans-signaling, albeit less efficiently than soluble IL-6R $\alpha$ . In line with this interpretation, co-immunoprecipitation and SPR experiments indicated that EBI3 binds IL-6.

An important pro-inflammatory function of IL-6 trans-signaling is to activate blood vessel endothelial cells. We observed that EBI3, in combination with IL-6 could induce the expression of chemokines by human venal endothelial cells.

Our results indicate that EBI3 can promote pro-inflammatory IL-6 functions by mediating trans-signaling. These unexpected observations suggest that use of EBI3 as a therapeutic biologic for autoimmune diseases will likely require co-administration of soluble gp130 to prevent the side effects associated with IL-6 trans-signaling. Together with previous studies that demonstrated activation of IL-6R by p28 (IL-30), new findings further suggest a complex interrelation between IL-27 and IL-6.

## INTRODUCTION

EBV-induced gene 3 (EBI3) encodes a 34-kDa soluble cytokine receptor that shares homologies with the p40 subunit of IL-12 and IL-23, and the non-signaling  $\alpha$  chain receptors of the IL-6 cytokine family (ciliary neurotrophic factor and IL-11 receptors) (1). As indicated by its name, EBI3 was identified as a transcript induced in B cells by EBV infection (2). EBI3 expression in peripheral blood cells can be triggered by mitogen activation (2). *In vivo*, EBI3 is present in interfollicular cells in tonsils, perifollicular cells in the spleen, and placental syncytial trophoblasts (3).

EBI3 pairs with IL-30 (p28) to form IL-27 (4), or, alternatively, with the p35 subunit of IL-12 to form IL-35 (5). Both IL-27 and IL-35 belong to the IL-6/IL-12 family of cytokines (6). IL-27 is mainly produced by activated dendritic cells and macrophages in response to Toll-like receptor ligands and pro-inflammatory cytokines (7). Its receptor comprises a unique IL-27R $\alpha$  chain and the gp130 chain shared with members of the IL-6 cytokine family (8). Initially identified as a CD4<sup>+</sup>T cell activator (4), IL-27 can induce signaling in a large array of immune and non-immune cells, notably T, B and myeloid cells. IL-27 has pleiotropic functions, including the regulation of inflammation in multiple models of infectious diseases (9). For example, it induces the secretion of IL-10 and limits inflammatory responses (10). It also inhibits Th17 CD4<sup>+</sup> T cell differentiation and show promising effects in EAE models of multiple sclerosis (11,12). Like other cytokines of the IL-12 family, IL-27 has potent anti-tumor effect in mouse models of cancer (13).

IL-35 is a composite cytokine produced by regulatory T cells (14). Like IL-27, IL-35 has anti-inflammatory roles in models of infectious diseases and EAE. IL-35, akin to IL-10 and TGF- $\beta$ , promotes the differentiation of human and mouse induced-T regulatory cells (iT<sub>R</sub>35) that play a key role in infection tolerance and contribute to tumor progression (15). IL-35 induces *ex-vivo* conversion of mouse or human B cells into IL-35 or IL-10 producing B-cells (16). Studies using cells deficient in hematopoietin receptor chains revealed that IL-35 signals through unconventional receptors comprising IL-12R $\beta$ 2 or gp130 homo- or hetero-dimers (17).

EBI3 lacks the cysteine homologous to the residue forming the inter-chain disulfide bond in IL-12 and IL-23, indicating that cytokines involving EBI3 may be more unstable than their counterparts that utilize p40 (1). Furthermore, the p28 subunit of IL-27, IL-30, which can be secreted independently of EBI3 (18) is an IL-6 receptor (IL-6R) ligand with pro-inflammatory activities (19,20). This suggests that injection of EBI3 or EBI3 derivatives such as EBI3-Fc fusion proteins could have therapeutic anti-inflammatory effect by favoring the formation of IL-27 and IL-35 complexes *in vivo*.

EBI3, like p40 can be secreted independent of its cytokine subunit partners (4,21). Secreted p40 homodimers have been shown to bind IL-12R and to have specific biological activities (22-25). Therefore, we investigated whether EBI3 has functions outside IL-27 or IL-35 complexes and whether such function could adversely affect the therapeutic use of recombinant EBI3 or EBI3 derivative in inflammatory or autoimmune diseases. We observed that EBI3 can activate gp130-expressing cells by mediating IL-6 trans-signaling.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cells and Reagents**—B9-IL-27R $\alpha$  and Ba/F3-gp130 cells were generated as described previously (20,26). Cells were grown in RPMI-1640 (Wisent Bio Products, St-Bruno, QC) supplemented with 10% FBS, 10 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 1% nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (all from Wisent) in the presence of IL-6 (10 ng/ml, R&D Systems, Cedarlane, Burlington, ON) or IL-3 (10 ng/ml, PeproTech Inc, Cedarlane) and hygromycin (1 mg/ml) for B9-IL-27R $\alpha$  and Ba/F3-gp130 respectively. High Five<sup>TM</sup> insect cells were cultured in Express Five<sup>®</sup> medium (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Burlington, ON) supplemented with 20 mM L-glutamine at 27°C. Flp-In-293 cells were expanded in DMEM medium (Wisent Bio Products) supplemented with 10% FBS. Human venal endothelial cells (HUVEC) were cultured in M-199 medium (ThermoFisher *Scientific*) supplemented with 20% FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 50  $\mu$ g/ml endothelial cell growth supplement and 100  $\mu$ g/ml Heparin in 0.1% collagen pre-coated dishes. Recombinant mIL-27, hIL-6, hIL11, hsIL-6R $\alpha$ , human soluble G-CSFR and human soluble gp130 were purchased from R&D systems (Cedarlane). The following primary antibodies were used: anti-His mAb (Qiagen Inc, Toronto, ON), anti-mEBI3 (clone # DNT27, eBioscience, Cedarlane), anti-mIL-6 (Clone # MP5-20F3, R&D Systems), biotinylated polyclonal anti-mIL-6 (R&D Systems), and anti-hIL-6 (Clone # 6708, R&D Systems). The following HRP-conjugated antibodies were used: anti-mouse IgG (GE Healthcare Biosciences, Cedarlane), anti-rat IgG and anti-goat IgG (R&D systems). HRP-labeled-streptavidin (GE Healthcare Biosciences) was used to detect biotinylated proteins and antibodies. The following antibodies were used at 5  $\mu$ g/ml to block the IL-6- and gp130-dependent activities: anti-mgp130 (Clone #

125623, R&D Systems), anti-mIL-6 (Biolegend, Cedarlane). For flow cytometry assay, FITC-labeled anti-phospho-STAT3 mAb and APC-labeled anti-phospho-CD4 mAb, were obtained from (*BD Biosciences*, Mississauga, ON).

***Experimental animals***—All procedures conformed to the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal (CDEA). Six- to 8-wk-old female C57BL/6 mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

***Expression and purification of mEBI3, mEBI3-IL-6 and mHyperIL-6 recombinant proteins***—Derivatives of the pIB/V5-His vector coding for a carboxy-6 His-tagged mEBI3 or mEBI3-IL-6 and mIL-6-sIL-6R (Hyper IL-6) fusion proteins linked by GGG(SGGGG)<sup>3</sup>SHHHHHH sequence were generated using synthetic DNA (GeneArt, ThermoFisher Scientific) and standard molecular biology methods and then transfected in *High Five*<sup>TM</sup> insect cells (ThermoFisher Scientific) according to the supplier's instructions. Transfected cells were selected using Blasticidin S hydrochloride (100 µg/ml). Batches of 500 ml of transfected cell culture medium were concentrated 25 times with Vivaflow<sup>®</sup> 200 crossflow cassettes (Sartorius Inc., Mississauga, ON) in the presence of 0.5 mM PMSF and purified by immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) using Ni-NTA agarose beads (Qiagen Inc) under the conditions suggested by the manufacturer. Purified proteins were dialyzed two times against PBS, sterile-filtered, quantified, and analyzed by Western blot for the presence of mEBI3 and mIL-6 using anti-penta His mAb followed by anti-mouse IgG HRP conjugated. Biological activity of mEBI3 was assessed using a B9 plasmacytoma proliferation assay (27).

***Expression and purification of bacterial EBI3***— Synthetic (GenArt) cDNA coding for 6 His/Avitag-tagged mouse and human mature EBI3 were subcloned in the expression plasmid pET24d (Novagen). Expression of EBI3 was performed in *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) as described (28). EBI3 was purified from bacterial inclusion bodies by IMAC under the denaturing conditions suggested by Qiagen. EBI3 was refolded by subsequent dialysis

against 20 mM glycine (pH 3.0), 0.2 mM oxidized glutathione and 2 mM reduced glutathione and decreasing urea concentrations. *EBI3* was sterile-filtered and quantified by SDS-PAGE and Coomassie blue staining using BSA as standard. Biological activity was assessed using a B9 plasmacytoma proliferation assay (27).

***Expression and purification of hEBI3-IL-6 fusion protein***— A synthetic pcDNA3.4 derivatives coding for a human EBI3-6H-(SGGG)<sup>3</sup>S-IL-6 fusion protein (GenArt) was transiently transfected in HEK 293T cells (ATCC, Cedarlane) using polyethylenimine (29). Transfected cells were maintained in Opti-MEM™ (ThermoFisher Scientific) for 5 days. Cell culture medium was concentrated by ultrafiltration. EBI3-IL-6 was purified by IMAC, sterile-filtered, quantified, and analyzed by Western blot for the presence of hEBI3 and hIL-6. Biological activity of the fusion protein was assessed using a B9 plasmacytoma proliferation assay (27).

***Proliferation assays***—Untransfected B9 cells, B9-IL-27R $\alpha$  or Ba/F3-gp130 cells were incubated for 72 h in triplicate with the indicated dilutions of recombinant proteins (19). For inhibitory studies, IL-6 or gp130 targeting antibodies (5  $\mu$ g/ml) or the anti-IL6/IL-6R $\alpha$  complex 25F10 mAb (10  $\mu$ g/ml; NovImmune, Plan-Les-Ouates, Switzerland) were added as indicated. Proliferation was measured using a fluorometric assay (AlamarBlue®, AbDSerotec, Cedarlane). Mean unstimulated cell fluorescence background was subtracted from the values obtained with the stimulated cells.

***Measurement of STAT3 activation by flow cytometry***—Untransfected B9 cells, B9-IL-27R $\alpha$  or Ba/F3-gp130 cells were serum and cytokine starved for 16 h. B9, B9-IL-27R $\alpha$ , Ba/F3-gp130 or C57BL/6 mouse primary splenocytes (10<sup>6</sup> cells /condition) were activated with cytokines in the presence or absence of anti-IL-6 mAb for 15 min or 16 h at 37°C. Cells were fixed, permeabilized and stained with FITC-labeled anti-phospho-STAT3 (Y705) and APC-labeled anti-CD4 mAbs as described (19). Fluorescence was assessed using a FACSCalibur (BD Biosciences). Data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star Inc, Ashland, OR).

**Measurement of STAT3 activation by Western blot**— Untransfected B9 cells or B9-IL-27R $\alpha$  cells were serum and cytokine starved for 16 h. Cells were then activated with cytokines in the presence or absence of anti-IL-6 mAb for 15 min or 16 h at 37°C. Cells were lysed in 1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA (pH 7.3). Protein levels were quantified using a bicinchoninic acid assay. Aliquots of lysates containing 20  $\mu$ g proteins were analysed by Western blot for total and phosphorylated STAT3 using specific Abs (Cell Signaling Technology) followed by HRP-labelled anti-rabbit IgG.

**Generation of stable HEK-293 transfectants co-expressing mEBI3 and mIL-6**— pcDNA5 derivatives coding for mIL-6, mEBI3, mIL-30 (p28) or the combination of these proteins were generated using synthetic cDNAs (GeneArt) and standard molecular biology techniques. For the bicistronic pcDNA5 vectors, the cDNA coding for mEBI3 and mIL-6 or mEBI3 and p28 (IL-27) were separated by a sequence coding for a T2A “self-cleaving peptide” (30). Stable Flp-In<sup>TM</sup>-293 transfectants were generated and selected following *ThermoFisher Scientific*’s protocol.

**Co-Immunoprecipitations and Western blotting**— Flp-In-293 transfectants expressing mIL-6, mIL-27 T2A or mEBI3-T2A-IL-6 were expanded to confluence in DMEM 10% FBS. Confluent cells were maintained in Opti-MEM<sup>TM</sup> medium for 72 h. Supernatants (20 ml) were concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal filters (EMD-Millipore). mEBI3 was immunoprecipitated using 1  $\mu$ g rat anti-mEBI3 (clone # DNT27, eBioscience) and 50  $\mu$ l agarose-conjugated anti-rat IgG antibody (Rockland, Cedarlane) for 16 h at 4°C. The immunoaffinity purified proteins were washed three times with cold PBS, and eluted with 0.1 M glycine-HCl pH 2.5. Eluted fractions were analyzed by Western blotting using anti-mEBI3 followed by HRP-conjugated anti-rat IgG or biotinylated anti-mIL-6 followed by HRP-conjugated streptavidin. For co-immunoprecipitation of mouse or human EBI3 and IL-6, 1  $\mu$ g of 6-His/Biotin tagged mEBI3 and 100 ng mIL-6 (R&D systems) or 5  $\mu$ g 6-His/Biotin tagged hEBI3 and 500 ng hIL-6 (R&D systems) were co-immunoprecipitated using His-select<sup>®</sup> HF Nickel affinity gel (Sigma Aldrich) for 16 h at 4°C in 1 ml of binding buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8). The immuno-affinity purified proteins were washed

three times with cold buffer containing (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8) and eluted with (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8). Eluted fractions were analyzed by Western blotting using streptavidin-HRP for EBI3 detection or polyclonal anti-mouse or human IL-6 (R&D Systems) followed by HRP-labelled anti-IgG for IL-6 detection.

***Surface plasmon resonance (SPR) binding assay***— Binding of IL-6 and IL-11 on EBI3 or G-CSFR was evaluated with surface plasmon resonance (SPR). All SPR measurements were acquired with a home-built instrument described elsewhere (31). In order to perform the binding assays, the SPR chip was functionalized with a peptide monolayer consisting of 3-mercaptopropyl-LHDLHD-OH(3-MPA-LHDLHD -OH) in conditions previously reported (32). Immobilizations of EBI3 and G-CSFR were realized using a peptide crosslinking reaction: First a baseline was acquired for 5 min in acidic water (pH 3) adjusted with hydrochloric acid or PBS adjusted to pH 4.5 with hydrochloric acid. Then a 1:1 solution of 35 mM ethyl-(dimethylaminopropyl) carbodiimide and 110 mM N-hydroxysuccinimide was injected for 5 min on the sensors in order to activate the carboxylic acid functions of the peptide monolayer immobilized at the surface of the SPR chip. The SPR chip was then washed with acidic water or PBS (pH 4.5) for 3 min. EBI3 or G-CSFR was diluted to 204 nM in acidic water or PBS (pH 4.5) and reacted with the SPR chip for 15 min. Subsequently, the EBI3 or G-CSFR solution was washed with acidic water or PBS (pH 4.5) for 3 min. Then, a 1 M ethanolamine solution (pH 8.5) was added for 5 min to block any remaining activated site on the sensor. Ethanolamine solution was washed with PBS (pH 7.4) for 3 min, then PBS with 0.1% BSA was injected for 5 min to further block any remaining active sites on the SPR chip. The surface was further washed with PBS (pH 7.4) for 3 min. A solution of IL-6 or IL-11 at 680 nM prepared in PBS (pH 7.4) was injected for 20 min before finally rinsing the sensor surface with PBS (pH 7.4) for 5 min.

***Determination of IL-6-EBI3 dissociation constant***— The dissociation constant ( $K_D$ ) of IL-6 and EBI3 was determined using experimental SPR data. The sensor surface was modified with EBI3 as described above. IL-6 solutions of concentrations ranging from 50 nM to 50  $\mu$ M were then exposed to the sensor surface for 5 min and rinsed with PBS (pH 7.4). The

shift of the SPR band for each concentration was used to determine the  $K_D$  using the Langmuir isotherm model with Matlab (Natick, MA) and the curve fitting toolbox. The equation used in Matlab is  $\Delta\lambda_{SPR} = [C/(K_D+C)] * \Delta\lambda_{SPR,max}$  and experimental data were fitted with a non linear least squares method. In the equation  $\Delta\lambda_{SPR}$  is the SPR shift for each concentration,  $C$  is the IL-6 concentration,  $K_D$  is the dissociation constant ( $K_D$ ) and  $\Delta\lambda_{SPR,max}$  is the maximum SPR shift calculated with the model.

***Binding assay of the EBI3-IL-6 fusion protein to gp130***— The binding of EBI3-IL-6 to gp130 was assessed by SPR. The sensor was coated with the peptide monolayer, which the carboxylic acid groups immobilized at the surface of the SPR chip were activated and washed as described above. Then, a 5  $\mu\text{g/ml}$  solution of soluble gp130 in PBS (pH 7.4) was reacted with the SPR chip for 20 min. The gp130 solution was washed with PBS (pH 7.4) for 1 min and with PBS + 0.1% BSA for 5 min. Then, a 1 M ethanolamine solution (pH 8.5) was added for 5 min to block any remaining activated site on the sensor. Ethanolamine solution was washed with PBS+0.1% BSA for 5 min. A 90 nM solution of either EBI3-IL-6 or EBI3 was injected for 15 min. Finally, the sensor surface was rinsed with PBS + 0.1% BSA for 5 min. EBI3-IL-6 and EBI3 solutions were prepared in PBS at pH 7.4 or pH 4.5, respectively.

***Human Endothelial Cell culture***—Confluent HUVEC cells in their fifth passage were kept for 4 h in M-199 plus 1% BSA. Medium was replaced with M-199 containing 1% BSA and 5  $\mu\text{g/ml}$  polymixin B in the presence or absence of IL-6 (10 ng/ml), sIL-6R $\alpha$  (100 ng/ml), EBI3 (0,1 - 2  $\mu\text{g/ml}$ ), EBI3-IL-6 recombinant fusion protein (200 ng/ml) or combination of either sIL-6R $\alpha$ -IL-6 or EBI3-IL-6 for 4 h at 37°C. For inhibition studies, blocking anti-gp130 Ab or isotype control (R&D systems) were used at 10  $\mu\text{g/ml}$ .

***Analysis of MCP-1 and MCP-3 expression by RT-PCR***—Expression of MCP-1 (NCBI accession no IR5047) and MCP-3 (NCBI accession no IR5048.2) was analyzed by real-time RT-PCR. Briefly, RNA was extracted using EZ-10 Column Total RNA Mini-Prep Kits (Bio Basic Inc, Markham, ON). RNA integrity was assessed using an Agilent Bioanalyzer at the genomic platform of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC, Montreal,



QC). Random-primed single-stranded cDNA was then synthesized using Mu-MLV reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) and 0.5 µg of total RNA. MCP-1 and MCP-3 cDNA levels were assessed using Taqman probes and a Taqman Fast qPCR MasterMix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific) at the IRIC genomic platform.

**Statistical Analysis**—Error bars represent a mean ± SD of triplicate cultures. Statistical analysis was performed using Student's unpaired t test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$ .

## RESULTS

***mEBI3 activates the IL-6-dependent mouse plasmacytoma cell line B9***—The B9 cell line is a mouse IL-6 dependant plasmacytoma widely used to measure mouse IL-6 biological activity (27). We previously generated a derivative of this cell line transfected with the IL-27R $\alpha$  cDNA that responds to IL-27 (Fig. 1, B, left panel) (20). We observed that the IL-27R $\alpha$  expressing B9 cells (B9-IL-27R) also respond in a dose dependant manner to recombinant mEBI3 (Fig. 1, B, right panel). To assess whether the observed effect reflects the capacity of mEBI3 to recruit and activate the IL-27R $\alpha$ , we tested the effect of mEBI3 on the unmodified B9 cells that express only the IL-6R $\alpha$  and therefore do not respond to IL-27 (Fig. 1, A, left panel). Unexpectedly, these cells also proliferated in response to mEBI3 (Fig. 1, A, right panel). As mEBI3 can form a composite cytokine with the IL-12 p35 subunit (IL-35) shown to activate homodimers of the signal transducing subunit of gp130 (17), we assessed the expression of p35 mRNA by B9 cells by real-time RT-PCR. No expression could be detected, suggesting that the observed proliferation was not due to the formation of IL-35 by an interaction between the exogenous EBI3 and B9-secreted p35 (data not shown).

***The mEBI3-induced B9 cell proliferation can be inhibited by anti-IL-6 and anti-gp130 mAbs***—B9 cells express low levels of IL-6 mRNA and proliferate in response to soluble IL-6R $\alpha$  in a dose dependent manner (27). This proliferation is believed to reflect trans-signaling induced by the formation of a soluble IL-6R $\alpha$ /IL-6 complex (10, 27). We therefore investigated whether mEBI3 can substitute for IL-6R $\alpha$  and promote B9 proliferation by trans-signaling. As

this signaling would imply the formation of a complex between recombinant mEBI3 and B9-secreted IL-6 followed by the recruitment and activation of gp130 by this initial complex (33), we first assessed the effect of blocking anti-IL-6 and anti-gp130 mAbs on EBI3-induced proliferation. Isotype-matched rat IgG was used as negative control. A marked inhibition of the mEBI3-induced B9 proliferation was observed either by blocking the gp130 receptor (Fig. 2, *A*) or the B9-secreted IL-6 (Fig. 2, *B*). These results indicate that both IL-6 and gp130 were involved in B9 proliferative response, supporting the hypothesis that mEBI3 could substitute for IL-6R $\alpha$  in the activation of gp130 by trans-signaling.

***The mEBI3-induced B9 cell proliferation can be inhibited by the trans-signaling inhibitory mAb 25F10***—We further explored the mechanism involved in the activation of B9 by mEBI3 using the mAb 25F10. This mAb, which was generated at NovImmune using the IL-6-IL-6R $\alpha$  complex as immunogen, can prevent IL-6 trans-signaling (34). Addition of mAb 25F10 inhibited B9-IL-27R cell proliferation induced by IL-6 but not by IL-27, included as control (Fig. 2, *C*). Interestingly, 25F10mAb also inhibited the proliferation of B9-IL-27R cells induced by mEBI3 (Fig. 2, *C*). To investigate whether the observed proliferation was IL-6R independent, we assessed the effect of blocking anti-IL-6R $\alpha$  mAb on IL-6, EBI3 or IL-27-induced proliferation using the B9-IL-27R transfectants: while IL-6-induced proliferation was inhibited, either EBI3 or IL-27 proliferations were unaffected in the presence of blocking anti-IL-6R mAb (Fig. 2, *D*). Collectively, these results suggest that, 1) mEBI3 can form a trans-signaling complex with IL-6 and that, 2) the EBI3-IL-6 and IL-6R $\alpha$ -IL-6 complexes are sufficiently similar for recognition by the same mAb. In line with this hypothesis, the epitope recognised by the mAb 25F10 has been mapped around Glu-261 in the D3 mIL-6R $\alpha$  domain (34). This residue diverge between mouse, human and rat IL-6R $\alpha$  (34) or between IL-6R $\alpha$  and EBI3 (34) but precedes the conserved Phe-262 (35).

***mEBI3 activates STAT3 phosphorylation in B9 and CD4 T cells and this phosphorylation is blocked by anti-IL-6 mAb***—We analyzed whether induction of B9 cell proliferation was paralleled by the activation of the JAK/STAT pathway. While 15 min stimulation with IL-6 induced a clear STAT3 tyrosine phosphorylation, no signal was observed

in response to mEBI3 (Fig. 3, A). As activation of B9 by a trans-signaling mechanism involving an EBI3-IL-6 complex would require a secretion of IL-6 in the B9 culture medium unlikely to occur in 15 min, we tested the effect of longer incubation. Interestingly, overnight incubation with mEBI3 resulted in a STAT3 phosphorylation detectable by flow cytometry (Fig. 3, A) or Western blot (Fig. 3, C) that could be prevented by the inclusion of a blocking anti-IL-6 mAb (Fig. 3, A and C). B9 transfectants expressing IL-27R $\alpha$  were used as control for the specificity of the blocking anti-IL-6 mAb (Fig. 3, B and C). Induction of STAT3 phosphorylation could be observed with EBI3 concentrations ranging from 0,5 to 2 mg/ml (Fig. 3 C). These results indicate that mEBI3 can induce the JAK/STAT signaling pathway in B9 cells and confirm the implication of IL-6 in the activation of B9 cells. To assess whether mEBI3 could also induce STAT3 phosphorylation in primary mouse cells, we stimulated mouse splenocytes with IL-6, IL-27 or mEBI3 for 15 min or 16 h and analysed STAT3 phosphorylation in CD4 T cells by flow cytometry (Fig. 4). Whereas no STAT3 activation could be detected in cells incubated with mEBI3 for 15 min, a detectable signal was observed at 16 h. This signal could be prevented by the inclusion of a blocking anti-IL-6 mAb (Fig. 4), suggesting that it was induced by a complex formed between the recombinant mEBI3 and IL-6 secreted by the splenocytes. These results suggest that EBI3 can form an active complex with IL-6.

***EBI3 forms a secreted complex with IL-6***—Next, we evaluated the binding between EBI3 and IL-6 by co-immunoprecipitation (Fig. 5). We generated stable HEK-293 transfectants expressing IL-6, IL-27 (i.e co-expressing EBI3 and IL-30) or a combination of EBI3 and IL-6. Both EBI3 and IL-6 were detected in respective transfectant cell culture medium (Fig. 5, A). When EBI3 was immunoprecipitated with a specific mAb, co-immunoprecipitation of IL-6 could be detected (Fig. 5, A, lower panel). As expected, no signal for IL-6 was observed when the co-immunoprecipitation assays were performed using medium containing IL-6 alone or IL-27 (Fig. 5, A, lower panel). To investigate whether both mouse and human EBI3 could bind IL-6, His-Biotin tagged mouse or human EBI3 was incubated with unconjugated mouse or human IL-6 and the mix was subjected to IMAC. Co-immunoprecipitation of EBI3 and IL-6 could be detected using HRP-labeled streptavidin to reveal EBI3 and anti-IL-6 to detect IL-6 (Fig. 5, B). As expected, no signal was observed when co-immunoprecipitation assays were performed

using medium containing only IL-6 (Fig. 5, *B*). These results indicate that both mouse and human EBI3 can bind IL-6.

***IL-6 binding to EBI3 could be detected by SPR***— We further proved binding of EBI3 with IL-6 with SPR measurements. EBI3 was covalently immobilized on the surface of the SPR chip and incubated with IL-6. A shift of approximately 3.5 nm was observed with IL-6 (Fig. 6, *A* and *D*). When EBI3 immobilized on the SPR chip was incubated with identical concentrations of IL-11, a background shift of 0.8 nm was observed (Fig. 1, *C* and *D*). When equal concentrations of soluble G-CSFR were immobilized on the surface by the same manner, a background shift of 0.8 nm was observed with IL-6 (Fig. 6, *B* and *D*). The significantly larger SPR response for EBI3-IL-6 confirms the selectivity of interaction between these proteins. We then used SPR to estimate the dissociation constant ( $K_D$ ) of the EBI3-IL-6 complex, which was measured at 4.1  $\mu$ M (Fig. 6, *E*). These data further indicate that EBI3 can bind IL-6.

***mEBI3-IL-6 activates gp130 expressing Ba/F3 cells***—Recombinant fusion proteins between sIL-6R $\alpha$ -IL-6 (“hyper-IL-6”) in which the complex is stabilized by a flexible linker have been widely used to demonstrate that the sIL-6R $\alpha$ -IL-6 complex can activate cells expressing only gp130 (“trans-signaling”) and, to investigate the role of IL-6 trans-signaling (36). We therefore assessed whether a structurally analogous fusion between EBI3 and IL-6 could, like hyper-IL-6, activate gp130-expressing Ba/F3 cells. Ba/F3 was chosen as this IL-3-dependant cell line does not express IL-6R $\alpha$ , can be rendered sensitive to other cytokines by transfection with the relevant receptor cDNA and has been widely used to study type I cytokine receptors (37). As expected, expressions of gp130 rendered Ba/F3 cells sensitive to hyper-IL-6, as well as to IL-27 since Ba/F3 spontaneously express IL-27R $\alpha$  (38) (Fig. 7, *A*, left panel). No proliferation in response to either IL-6 (Fig. 7, *A*, left panel) or EBI3 alone could be detected (Fig. 7, *A*, right panel), confirming that these transfectants do not constitutively express either IL-6 or IL-6R $\alpha$  and are therefore suitable for investigating the trans-signaling capacity of the EBI3-IL-6 fusion. A clear proliferation in response to the EBI3-IL-6 fusion protein was observed (Fig. 7, *A*, right panel). The EBI3-IL-6 fusion protein could also stimulate the activation of STAT3 (Fig. 7, *B*). The up-regulation of STAT3 phosphorylation induced by 30

min stimulations with 1  $\mu\text{g/ml}$  of EBI3-IL-6 was however substantially lower than that induced by hyper-IL-6 at 100 ng/ml. All together, these results indicate that EBI3 can mediate IL-6 trans-signaling, albeit less potently than sIL-6R $\alpha$ .

***EBI3-IL-6 binds immobilized gp130***— We covalently immobilized human soluble gp130 on the surface of the SPR chip and incubated it with hEBI3-IL-6 fusion or hEBI3. While the scarcity of the purified protein limited the concentration that could be used to a maximum about 55 time lower than that used for the IL-6 binding to EBI3, a smaller, albeit significant shift of approximately 0.5 nm was observed (Fig. 8, *A* and *C*), while no signal was detected with EBI3, indicating that hEBI3-IL-6 binds gp130 (Fig. 8 *B* and *C*).

***Induction of chemokine production by EBI3-mediated IL-6 trans-signaling***— Previous reports indicate that IL-6-induced chemokine production by HUVEC is strictly mediated by trans-signaling and that it can be induced using combinations of IL-6 and sIL-6R $\alpha$  (39). Therefore, we used this system to investigate whether EBI3 could mediate trans-signaling on human cells. When HUVEC were stimulated for 4 h in the presence of sIL-6R $\alpha$  and IL-6, a strong up-regulation of MCP-1 and MCP-3 mRNA could be observed (Fig. 9, *A*). Interestingly, up-regulation of MCP-1 and MCP-3 mRNA levels was also induced by the conjunction of hIL-6 and hEBI3, albeit less efficiently (Fig. 9, *A*). As expected, no chemokine mRNA up-regulation was detected when cells were stimulated with hIL-6 alone, confirming that trans-signaling was required for the induction of chemokine production by HUVEC. Up-regulation of MCP-1 and MCP-3 mRNA levels could be detected with EBI3 concentrations comprised between 0.5 and 2  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 9, *B*) These results indicate that EBI3 can mediate IL-6 trans-signaling in human cells .

***EBI3-mediated IL-6 Trans-signaling can be induced by EBI3-IL-6 fusion protein and inhibited by anti-gp130 mAb***—We next observed that the up-regulation of MCP-3 mRNA level can also be induced by the hEBI3-IL-6 fusion and that the responses induced by the combinations of sIL-6R $\alpha$  and IL-6, of EBI3 and IL-6 or hEBI3-IL-6 can be inhibited by the

inclusion of anti-gp130 mAb (Fig. 9, C). These results indicate that EBI3 can mediate IL-6 trans-signaling through gp130.

## DISCUSSION

IL-6 is a cytokine that elicits a broad range of immune and acute phase responses with both pro- and anti-inflammatory functions. The dual role of this cytokine, at least in part, depends on the nature of the signaling pathway induced: IL-6 “classical” cis-signaling involving membrane IL-6R $\alpha$  is believed to maintain body homeostasis, while IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor mediates most pro-inflammatory responses (40, 41). We and others observed that IL-30, the p28 subunit of IL-27, has functions unrelated to its capability to form a complex with EBI3: it can activate the IL-6 receptor by cis- or trans-signaling and trigger the differentiation of B cells in plasmocytes (19, 20, 42). That EBI3 also has roles unrelated to IL-27 is suggested by publications indicating its presence in tissues negative for p28: no significant p28 expression was detected in EBI3-secreting Hodgkin lymphoma derived cell lines, in EBV-transformed B cell lines (43) or in EBI3-expressing tumor-infiltrating dendritic cells (43). While the report did not rule out that these cells express p35, authors suggested that EBI3 regulates immune response independently from its association to p28. In accordance with this hypothesis, EBI3 is involved in transplantation tolerance induced by tolerogenic dendritic cells in mice through a mechanism involving IFN- $\gamma$  expression by double negative T cells in the absence of both p35 and p28 partners (44). Furthermore, EBI3 expression was shown to be up-regulated in response to IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  in human intestinal epithelial cells, suggesting a potential role for EBI3 in the early host response to inflammation with no observed expression of p28, and lack of coordination with p35 (45).

Studies investigating the role of EBI3 were mostly based on the use of EBI3-deficient mouse model (46, 48). While testing its biological activities *in vitro*, we observed that EBI3 supports the proliferation of the IL-6-responsive mouse plasmacytoma cell line B9. This cell line is IL-27-unresponsive (20) indicating that EBI3 could have IL-27R $\alpha$ -independent regulatory roles. Previous studies revealed that sIL-6R $\alpha$  induces B9 cell proliferation through a

trans-signaling pathway involving the formation of a complex between minute amounts of IL-6 secreted by the plasmacytoma cell line and exogenous sIL-6R $\alpha$  (27). Our analysis of the activation of B9 cells by EBI3 indicated that it could be blocked by either anti-gp130 or anti-IL-6 mAbs and that induction of STAT3 phosphorylation required a long stimulation time. This suggests that proliferation was induced through an analogous trans-signaling triggered by an alternative complex formed by the B9-released IL-6 and recombinant EBI3. Also in agreement with this hypothesis, we observed in co-immunoprecipitation studies that EBI3 binds IL-6 when the two proteins are co-expressed or mixed *in vitro* or in SPR binding assays. To further test the ability of EBI3 to mediate IL-6 trans-signaling, we produced an EBI3-IL-6 fusion protein structurally similar to the “hyperIL-6” used to study IL-6 trans-signaling (36). This fusion protein could induce the activation of Ba/F3 cells transfected with gp130, albeit less potently than hyper IL-6. We investigated the effect of EBI3 on primary splenocytes and observed that it could induce an IL-6-dependent STAT3 activation in the CD4 T-cells.

A physiologically important pro-inflammatory role of IL-6 trans-signaling is to activate IL-6R $\alpha$  negative endothelial cells (49). HUVEC have been used as a model to assess the effect of IL-6 trans-signaling in human endothelial cells (39). We observed that EBI3 could, in conjunction with IL-6, induce MCP-1 and MCP-3 gene expression in HUVEC, indicating that EBI3 can mediate IL-6 trans-signaling in human cells and suggesting that the EBI3/IL-6 complex could be involved in the recruitment of leucocytes at sites of inflammation.

Our results imply that EBI3 could have either pro- or anti-inflammatory effects on gp130-expressing cells depending on its binding to the cytokine partner subunits p35, IL-30 (p28), or IL-6. The effects of EBI3 on IL-6 trans-signaling were observed with EBI3 concentrations between 500 ng and 2  $\mu$ g/ml much higher than those detected in peripheral blood (3). These concentrations are however close to those detected in sera during the last months of pregnancy (117-446 ng/ml) (3) suggesting that EBI3 could contribute to the role of IL-6 in preterm delivery (50), believed to involve trans-signaling (51). These data and previous observation that IL-30 can activate the IL-6 receptor by cis- or trans-signaling (18-20) further demonstrate a high level of complexity and interchangeability in this family of cytokines and

cytokine receptors (52). Our observations suggest caution in using EBI3-derivatives as potential therapeutic agents to favour the generation or stabilization of IL-27 and IL-35 through complexing unbound IL-30 or p35. Further studies should indicate whether this novel EBI3 activity contributes to IL-6 trans-signaling in autoimmune and inflammatory diseases models.

**Acknowledgments:** We thank the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) genomic platform for the DNA sequencing and the real-time PCR analysis. We are grateful to the group of Dr. Jean-Philippe Gratton (Département de Pharmacologie, Université de Montréal) for the gift of HUVEC and for their advice and help with the HUVEC experiments. We thank Mr. S. Sénéchal (Flow cytometry platform, Université de Montréal) for help with flow cytometry.

This work was supported by The Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP- 57832 to Jean-François Gauchat and the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, grant 412305-2011 to Jean-François Masson.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**Author contributions:** SC performed most of the experiments. JLC conducted the experiments using SPR. The paper was written by SC, J-FG, J-FM and MS with contributions of all other authors. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.



## REFERENCES

1. Jones, L. L., and Vignali, D. A. (2011) Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol Res* **51**, 5-14
2. Devergne, O., Hummel, M., Koeppen, H., Le Beau, M. M., Nathanson, E. C., Kieff, E., and Birkenbach, M. (1996) A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* **70**, 1143-1153
3. Devergne, O., Coulomb-L'Hermine, A., Capel, F., Moussa, M., and Capron, F. (2001) Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pathol* **159**, 1763-1776
4. 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) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity* **16**, 779-790
5. Devergne, O., Birkenbach, M., and Kieff, E. (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
6. Vignali, D. A., and Kuchroo, V. K. (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* **13**, 722-728
7. Pirhonen, J., Siren, J., Julkunen, I., and Matikainen, S. (2007) IFN- $\alpha$  regulates Toll-like receptor-mediated IL-27 gene expression in human macrophages. *J Leukoc Biol* **82**, 1185-1192
8. 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) WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* **172**, 2225-2231
9. Bosmann, M., and Ward, P. A. (2013) Modulation of inflammation by interleukin-27. *J Leukoc Biol* **94**, 1159-1165
10. Freitas do Rosario, A. P., Lamb, T., Spence, P., Stephens, R., Lang, A., Roers, A., Muller, W., O'Garra, A., and Langhorne, J. (2012) IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4<sup>+</sup> T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *J Immunol* **188**, 1178-1190
11. Stumhofer, J. S., Laurence, A., Wilson, E. H., Huang, E., Tato, C. M., Johnson, L. M., Villarino, A. V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., Saris, C. J., O'Shea, J. J., Hennighausen, L., Ernst, M., and Hunter, C. A. (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
12. Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N. M., Danilenko, D. M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F. J., and Ghilardi, N. (2006) Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* **7**, 929-936

13. Liu, Z., Yu, J., Carson, W. E., 3rd, and Bai, X. F. (2013) The role of IL-27 in the induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocyte response. *Am J Transl Res* **5**, 470-480
14. Li, X., Mai, J., Virtue, A., Yin, Y., Gong, R., Sha, X., Gutchigian, S., Frisch, A., Hodge, I., Jiang, X., Wang, H., and Yang, X. F. (2012) IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One* **7**, e33628
15. Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C. J., Brown, S. A., Rehg, J. E., Jones, M. L., Ni, H. T., Artis, D., Turk, M. J., and Vignali, D. A. (2010) IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol* **11**, 1093-1101
16. Wang, R. X., Yu, C. R., Dambuza, I. M., Mahdi, R. M., Dolinska, M. B., Sergeev, Y. V., Wingfield, P. T., Kim, S. H., and Egwuagu, C. E. (2014) Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* **20**, 633-641
17. Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A. R., Garcia, K. C., Hunter, C. A., Drake, C. G., Murray, P. J., and Vignali, D. A. (2012) The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol* **13**, 290-299
18. Stumhofer, J. S., Tait, E. D., Quinn, W. J., 3rd, Hosken, N., Spudy, B., Goenka, R., Fielding, C. A., O'Hara, A. C., Chen, Y., Jones, M. L., Saris, C. J., Rose-John, S., Cua, D. J., Jones, S. A., Elloso, M. M., Grotzinger, J., Cancro, M. P., Levin, S. D., and Hunter, C. A. (2010) A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling. *Nat Immunol* **11**, 1119-1126
19. Crabe, S., Guay-Giroux, A., Tormo, A. J., Duluc, D., Lissilaa, R., Guilhot, F., Mavoungou-Bigouagou, U., Lefouili, F., Cognet, I., Ferlin, W., Elson, G., Jeannin, P., and Gauchat, J. F. (2009) The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling. *J Immunol* **183**, 7692-7702
20. Tormo, A. J., Meliani, Y., Beaupre, L. A., Sharma, M., Fritz, J. H., Elson, G., Crabe, S., and Gauchat, J. F. (2013) The composite cytokine p28/cytokine-like factor 1 sustains B cell proliferation and promotes plasma cell differentiation. *J Immunol* **191**, 1657-1665
21. Jones, L. L., Chaturvedi, V., Uyttenhove, C., Van Snick, J., and Vignali, D. A. (2012) Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. *Mol Immunol* **51**, 234-244
22. Jana, M., Dasgupta, S., Pal, U., and Pahan, K. (2009) IL-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, induces nitric oxide synthase in microglia via IL-12R beta 1. *Glia* **57**, 1553-1565
23. Brahmachari, S., and Pahan, K. (2008) Role of cytokine p40 family in multiple sclerosis. *Minerva Med* **99**, 105-118
24. Shimozato, O., Ugai, S., Chiyo, M., Takenobu, H., Nagakawa, H., Wada, A., Kawamura, K., Yamamoto, H., and Tagawa, M. (2006) The secreted form of the p40 subunit of interleukin (IL)-12 inhibits IL-23 functions and abrogates IL-23-mediated antitumor effects. *Immunology* **117**, 22-28
25. Mondal, S., Roy, A., and Pahan, K. (2009) Functional blocking monoclonal antibodies against IL-12p40 homodimer inhibit adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* **182**, 5013-5023

26. Tormo, A. J., Beaupre, L. A., Elson, G., Crabe, S., and Gauchat, J. F. (2013) A polyglutamic acid motif confers IL-27 hydroxyapatite and bone-binding properties. *J Immunol* **190**, 2931-2937
27. Diamant, M., Hansen, M. B., Rieneck, K., Svenson, M., Yasukawa, K., and Bendtzen, K. (1994) Stimulation of the B9 hybridoma cell line by soluble interleukin-6 receptors. *J Immunol Methods* **173**, 229-235
28. Cognet, I., Guillhot, F., Chevalier, S., Guay-Giroux, A., Bert, A., Elson, G. C., Gascan, H., and Gauchat, J. F. (2004) Expression of biologically active mouse ciliary neurotrophic factor (CNTF) and soluble CNTFRalpha in Escherichia coli and characterization of their functional specificities. *Eur Cytokine Netw* **15**, 255-262
29. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S., and Leahy, D. J. (2013) Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol* **529**, 227-240
30. Szymczak, A. L., Workman, C. J., Wang, Y., Vignali, K. M., Dilioglou, S., Vanin, E. F., and Vignali, D. A. (2004) Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* **22**, 589-594
31. Zhao, S. S., Bukar, N., Toulouse, J. L., Pelechacz, D., Robitaille, R., Pelletier, J. N., and Masson, J. F. (2015) Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosens Bioelectron* **64**, 664-670
32. Ratel, M., Provencher-Girard, A., Zhao, S. S., Breault-Turcot, J., Labrecque-Carbonneau, J., Branca, M., Pelletier, J. N., Schmitzer, A. R., and Masson, J. F. (2013) Imidazolium-based ionic liquid surfaces for biosensing. *Anal Chem* **85**, 5770-5777
33. Thibault, V., Richards, C. D., Botelho, F., and Gauldie, J. (1997) Antibodies to rat soluble IL-6 receptor stimulate B9 hybridoma cell proliferation. *FEBS Lett* **408**, 182-186
34. Lacroix, M., Rousseau, F., Guillhot, F., Malinge, P., Magistrelli, G., Herren, S., Jones, S. A., Jones, G. W., Scheller, J., Lissilaa, R., Kosco-Vilbois, M., Johnson, Z., Buatois, V., and Ferlin, W. (2015) Novel Insights into Interleukin 6 (IL-6) Cis- and Trans-signaling Pathways by Differentially Manipulating the Assembly of the IL-6 Signaling Complex. *J Biol Chem* **290**, 26943-26953
35. Rousseau, F., Basset, L., Froger, J., Dinguirard, N., Chevalier, S., and Gascan, H. (2010) IL-27 structural analysis demonstrates similarities with ciliary neurotrophic factor (CNTF) and leads to the identification of antagonistic variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19420-19425
36. Peters, M., Blinn, G., Solem, F., Fischer, M., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Rose-John, S. (1998) In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol* **161**, 3575-3581
37. Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grotzinger, J., and Rose-John, S. (1997) I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* **15**, 142-145
38. Sprecher, C. A., Grant, F. J., Baumgartner, J. W., Presnell, S. R., Schrader, S. K., Yamagiwa, T., Whitmore, T. E., O'Hara, P. J., and Foster, D. F. (1998) Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 82-90
39. Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G., and

- Mantovani, A. (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* **6**, 315-325
40. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 878-888
  41. Rose-John, S. (2012) IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* **8**, 1237-1247
  42. Garbers, C., Spudy, B., Aparicio-Siegmund, S., Waetzig, G. H., Sommer, J., Holscher, C., Rose-John, S., Grotzinger, J., Lorenzen, I., and Scheller, J. (2013) An interleukin-6 receptor-dependent molecular switch mediates signal transduction of the IL-27 cytokine subunit p28 (IL-30) via a gp130 protein receptor homodimer. *J Biol Chem* **288**, 4346-4354
  43. Larousserie, F., Bardel, E., Pflanz, S., Arnulf, B., Lome-Maldonado, C., Hermine, O., Bregeaud, L., Perennec, M., Brousse, N., Kastelein, R., and Devergne, O. (2005) Analysis of interleukin-27 (EBI3/p28) expression in Epstein-Barr virus- and human T-cell leukemia virus type 1-associated lymphomas: heterogeneous expression of EBI3 subunit by tumoral cells. *Am J Pathol* **166**, 1217-1228
  44. Hill, M., Thebault, P., Segovia, M., Louvet, C., Beriou, G., Tilly, G., Merieau, E., Anegon, I., Chiffolleau, E., and Cuturi, M. C. (2011) Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am J Transplant* **11**, 2036-2045
  45. Maaser, C., Egan, L. J., Birkenbach, M. P., Eckmann, L., and Kagnoff, M. F. (2004) Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 and other interleukin-12-related molecules by human intestinal epithelium. *Immunology* **112**, 437-445
  46. Chung, Y., Yamazaki, T., Kim, B. S., Zhang, Y., Reynolds, J. M., Martinez, G. J., Chang, S. H., Lim, H., Birkenbach, M., and Dong, C. (2013) Epstein Barr virus-induced 3 (EBI3) together with IL-12 negatively regulates T helper 17-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS Pathog* **9**, e1003628
  47. Liu, J. Q., Liu, Z., Zhang, X., Shi, Y., Talebian, F., Carl, J. W., Jr., Yu, C., Shi, F. D., Whitacre, C. C., Trgovcich, J., and Bai, X. F. (2012) Increased Th17 and regulatory T cell responses in EBV-induced gene 3-deficient mice lead to marginally enhanced development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **188**, 3099-3106
  48. Nieuwenhuis, E. E., Neurath, M. F., Corazza, N., Iijima, H., Trgovcich, J., Wirtz, S., Glickman, J., Bailey, D., Yoshida, M., Galle, P. R., Kronenberg, M., Birkenbach, M., and Blumberg, R. S. (2002) Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16951-16956
  49. Hou, T., Tieu, B. C., Ray, S., Recinos Iii, A., Cui, R., Tilton, R. G., and Brasier, A. R. (2008) Roles of IL-6-gp130 Signaling in Vascular Inflammation. *Curr Cardiol Rev* **4**, 179-192
  50. Chiesa, C., Pacifico, L., Natale, F., Hofer, N., Osborn, J. F., and Resch, B. (2015) Fetal and early neonatal interleukin-6 response. *Cytokine* **76**, 1-12
  51. Lee, S. Y., Buhimschi, I. A., Dulay, A. T., Ali, U. A., Zhao, G., Abdel-Razek, S. S., Bahtiyar, M. O., Thung, S. F., Funai, E. F., and Buhimschi, C. S. (2011) IL-6 trans-signaling system in intra-amniotic inflammation, preterm birth, and preterm premature rupture of the membranes. *J Immunol* **186**, 3226-3236

52. Garbers, C., Hermanns, H. M., Schaper, F., Muller-Newen, G., Grotzinger, J., Rose-John, S., and Scheller, J. (2012) Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* **23**, 85-97

## FOOTNOTES

Abbreviations used: EBI3, EBV-induced gene 3; G-CSFR, granulocyte colony-stimulating factor receptor; gp130, glycoprotein 130; hEBI3, human EBI3; hIL-6, human IL-6; mIL-6, mouse IL-6; sIL-6R, soluble IL-6 receptor; SPR, surface plasmon resonance.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1. EBI3 activates IL-6-dependent mouse plasmacytoma cell line B9.** Untransfected B9 cells (A) or B9 cells stably transfected with mouse IL-27R $\alpha$  cDNA (B) were incubated with the indicated concentrations of mEBI3, IL-6, IL-3 or IL-27 for 72 h, and proliferation was measured by fluorescence using the AlamarBlue® colorimetric assay. Error bars indicate the SD of triplicate cultures. Data are representative three independent experiments.

**FIGURE 2. EBI3-induced B9 cell proliferation can be inhibited by anti-IL-6, anti-gp130, and 25F10, a mAb that block IL-6 trans-signaling.** Untransfected B9 cells were incubated with mEBI3 (500 ng/ml), IL-6 (0.01 ng/ml) or IL-27 (100 ng/ml) with or without anti-gp130 (A), anti-IL-6 (B), 25F10 (C) mAbs or (D) anti-IL-6R. Proliferation was measured as described in Fig. 1. Error bars indicate the SD of triplicate cultures. Statistical differences between IL-6±mAbs and EBI3±mAbs were determined using Student's t test. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Data are representative of three independent experiments.

**FIGURE 3. EBI3 activates STAT3 phosphorylation in B9 cells and this phosphorylation is IL-6 dependent.** (A) B9 cells were stimulated with mEBI3 (1  $\mu$ g/ml), IL-27 (100 ng/ml) or IL-6 (100 ng/ml) for 15 min or 16 h with or without anti-IL-6 mAb. (B) B9 cells stably transfected with mouse IL-27R $\alpha$  cDNA were stimulated with IL-27 (100 ng/ml) for 15 min with or without anti-IL-6 mAb. Cells were fixed, permeabilized, and stained with FITC-labeled anti-pSTAT3.

Fluorescence was assessed by flow cytometry. Filled histograms indicate unstimulated cells. Mean fluorescence intensity values of the unstimulated (left) and stimulated cells (right) are indicated in the histograms. (C) B9 Cells were stimulated with mEBI3 (0,5, 1 or 2 µg/ml) for 16 h, IL-27 (100 ng/ml) or IL-6 (100 ng/ml) for 15 min with or without anti-IL-6 mAb. (D) B9 cells stably transfected with mouse IL-27R $\alpha$  cDNA were stimulated with IL-27 (100 ng/ml) for 15 min with or without anti-IL-6 mAb. Cell lysates were analysed by Western blot using anti-pSTAT3 or anti-STAT3 followed by anti-rabbit IgG-HRP. Data are representative of three independent experiments.

**FIGURE 4. EBI3 activates STAT3 phosphorylation in CD4<sup>+</sup> T cells and this phosphorylation is blocked by anti-IL-6 mAb.** Mouse splenocytes were stimulated with mEBI3 (1 µg/ml), IL-27 (100 ng/ml) or IL-6 (100 ng/ml) for 15 min or 16 h with or without anti-IL-6 mAb. Cells were fixed, permeabilized, and stained with APC-labeled anti-CD4 and FITC-labeled anti-pSTAT3. Fluorescence was measured by flow cytometry. Histograms represent the fluorescence of the cells gated for CD4 expression. Filled histograms indicate unstimulated cells. Mean fluorescence intensity values of the controls (left) and stimulated cells (right) are indicated in the histograms. Data are representative of three independent experiments.

**FIGURE 5. EBI3 forms a secreted complex with IL-6.** (A) HEK-239 Flp-In™ cells were transfected with expression vectors coding for mEBI3-T2A-IL-6 (clone#1 and #2), mL-27T2A, and mL-6. Proteins were immunoprecipitated from cellular supernatants using anti-mEBI3 mAb and anti-rat IgG agarose resin. Signals for mEBI3 (35 KDa) and mL-6 (25 KDa) were revealed by successive incubation with anti-mEBI3 and biotinylated anti-mIL-6 Abs followed by anti-rat IgG-HRP and streptavidin-HRP respectively. Signals at 50 and 25 KDa represent background due to the detection of the Ig heavy and light chains eluted from rat IgG agarose by the secondary antibody used for EBI3 detection. (B) His-biotin tagged recombinant mouse or human EBI3 and unconjugated mouse or human IL-6 were subjected to IMAC. NI-NTA resin incubated without the addition of EBI3 and IL-6 was used as negative control (resin lanes). EBI3 (100 ng) and IL-6 (20 ng) were used as positive detection controls. Signals were revealed with either streptavidin-HRP or anti-IL-6 followed by HRP-conjugated anti-IgG.

**FIGURE 6. EBI3-IL-6 interaction assessed by SPR.** (A) EBI3 or (B) G-CSFR was immobilized via EDC/NHS on 50 nm-thick gold surface coated with a peptide monolayer as indicated in "Experimental Procedures" section. Conditions of binding and washing were indicated. (C) The sensorgrams for the binding of IL-6 on EBI3 and G-CSFR clearly show the preferential interaction of EBI3 and IL-6. PBS (pH 7.4) rinsing are also shown. Data are representative three independent experiments.

**FIGURE 7. EBI3-IL-6 fusion protein activates gp130-expressing Ba/F3 cells.** (A) BAF/3 cells stably transfected with mouse gp130 cDNA were incubated with the indicated concentrations of mEBI3, IL-6, IL-27, mEBI3-IL-6 fusion (EBI3-IL-6 Fus), or hyperIL-6 for 72 h. Proliferation was measured as described in Fig. 1. Error bars indicate the SD of triplicate cultures. (B) BAF/3-gp130 were stimulated with mEBI3 (1  $\mu$ g/ml), mEBI3-IL-6 fusion (1  $\mu$ g/ml) or HyperIL-6 (100 ng/ml) for 30 min. Cells were fixed, permeabilized, and stained with FITC-labeled anti-pSTAT3. Fluorescence was measured by flow cytometry. Filled histograms indicate unstimulated cells. Mean fluorescence intensity values of the non-stimulated (left) and stimulated cells (right) are indicated in the histograms. Data are representative of three independent experiments.

**FIGURE 8. EBI3-IL-6 fusion interaction with soluble gp130 assessed by SPR.** Soluble gp130 was immobilized via EDC/NHS on 50 nm-thick gold surface coated with a peptide monolayer as indicated in "Experimental Procedures" section. The sensorgram for EBI3-IL-6 (A and C) or EBI3 (B and C) are indicated. PBS (pH 7.4 or 4.5) rinsing are also shown. The decrease of the SPR signal observed with the injection of EBI3 is due to the different refractive index of the solution. Data are representative three independent experiments.

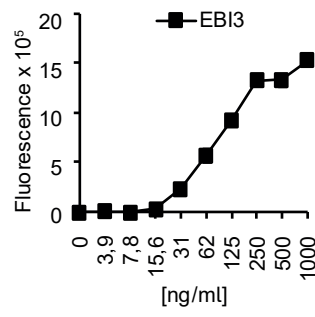
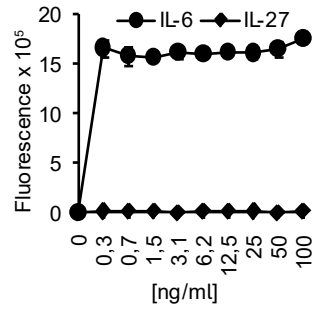
**FIGURE 9. The combination of IL-6 and EBI3 induces chemokine mRNA expression in HUVEC in a dose dependent manner and this expression is blocked by anti-gp130 mAb.** (A) Cells were stimulated for 4 h with EBI3 (1  $\mu$ g/ml) and sIL-6R (100 ng/ml) with or without IL-6 (10 ng/ml). (B) Cells were stimulated for 4 h with IL-6 (10 ng/ml) and an increased concentrations of EBI3. (C) Cells were stimulated for 4 h with EBI3 (2  $\mu$ g/ml) and IL-6 (10

ng/ml) or with EBI3-IL-6 recombinant fusion protein (200 ng/ml) with or without anti-gp130 mAb. Gene expression was assessed by real-time RT-PCR. Statistical differences between sIL-6R±IL-6 and EBI3±IL-6 were determined using a Student's T test. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \* $p < 0.05$ . Error bars in the figures represent SD of triplicate cultures. Data are representative of two independent experiments.



Figure 1

A



B

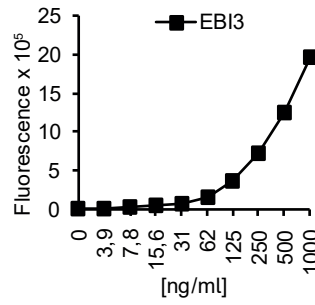
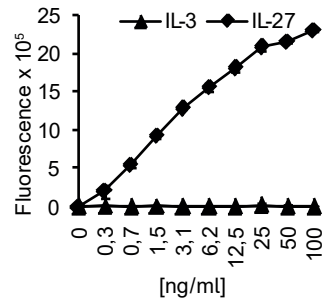


Figure 2

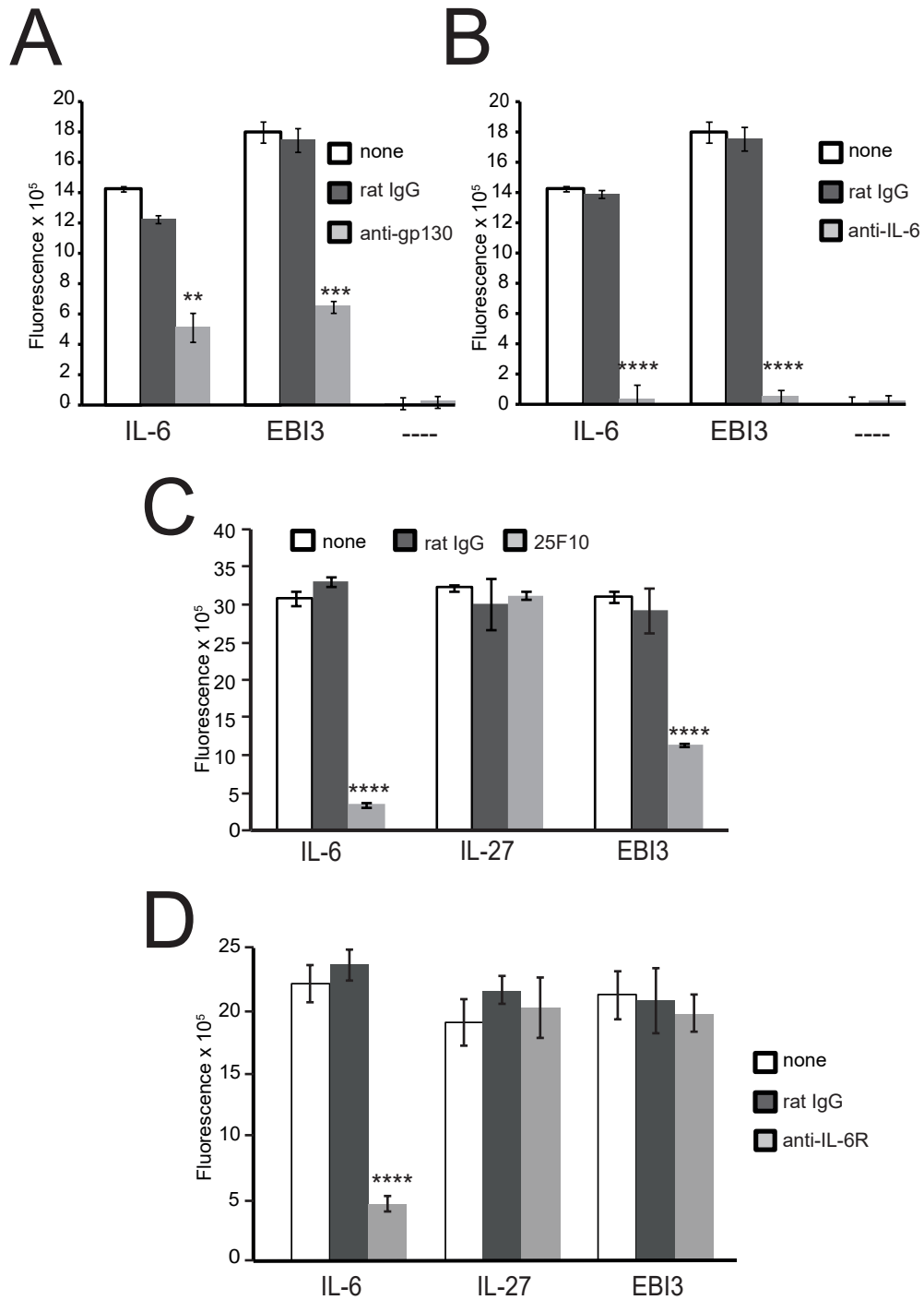


Figure 3

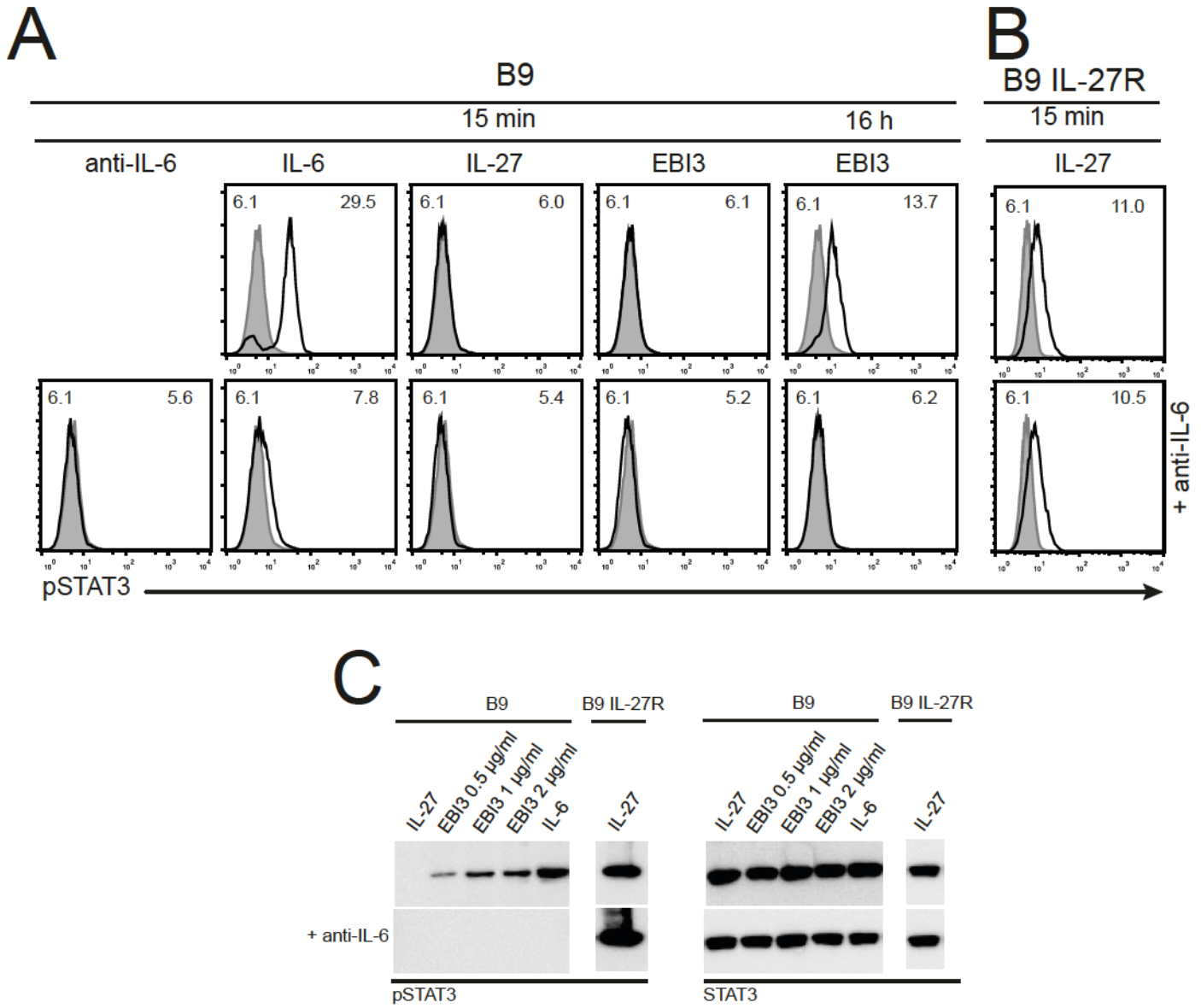


Figure 4

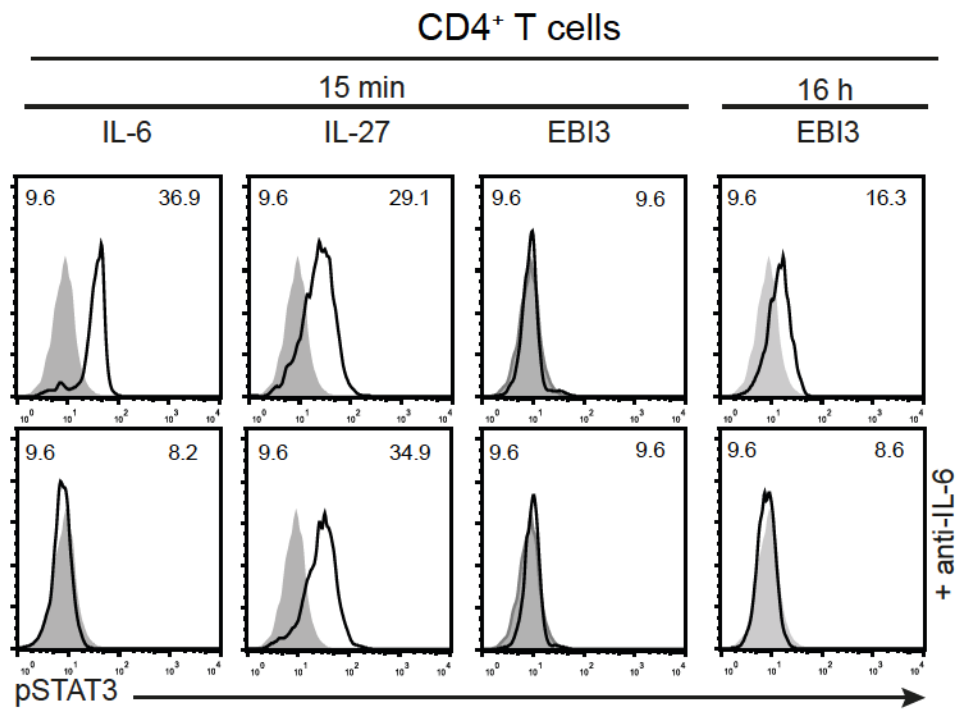


Figure 5

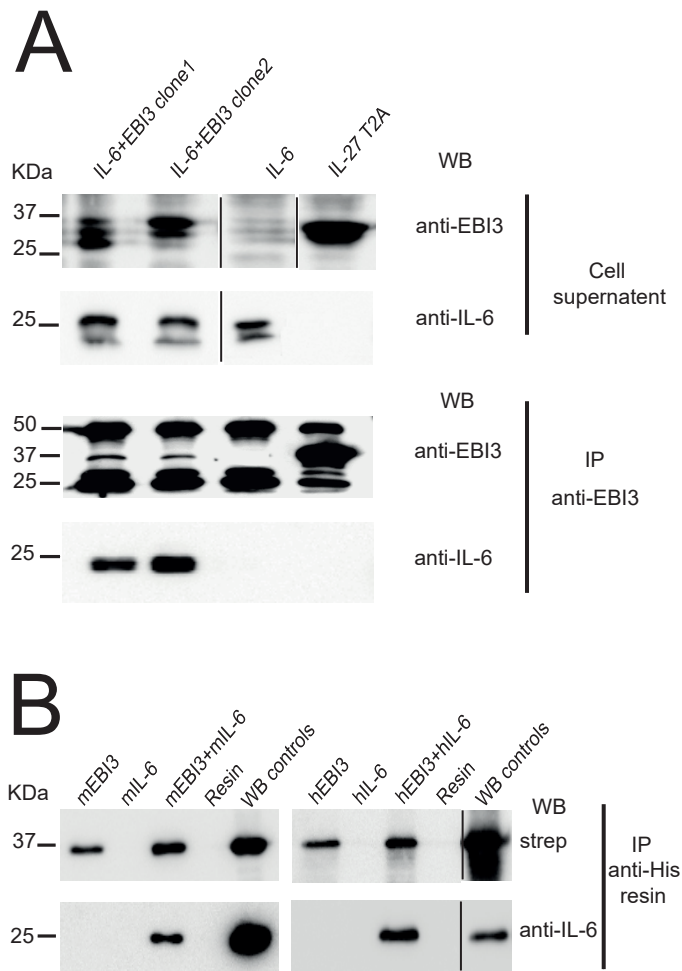


Figure 6

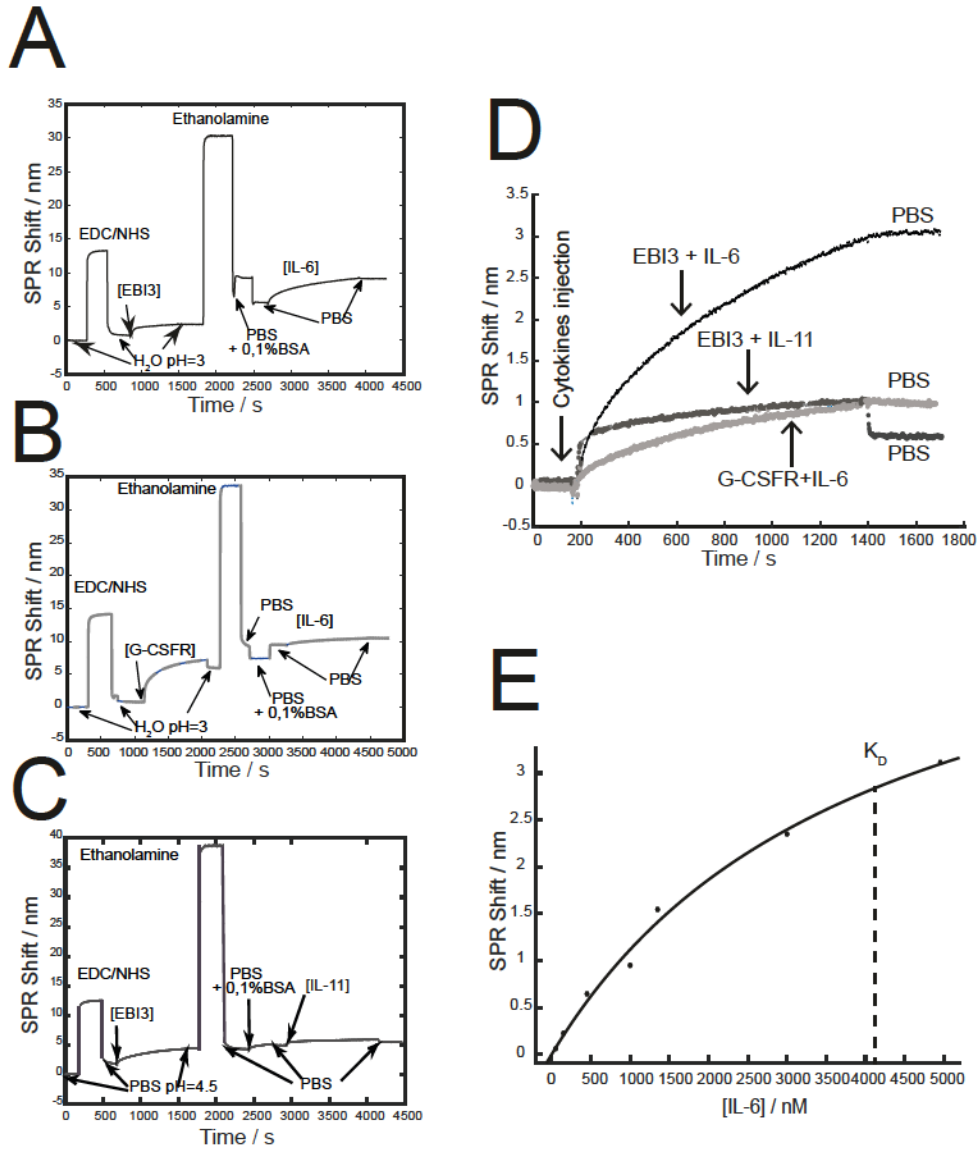


Figure 7

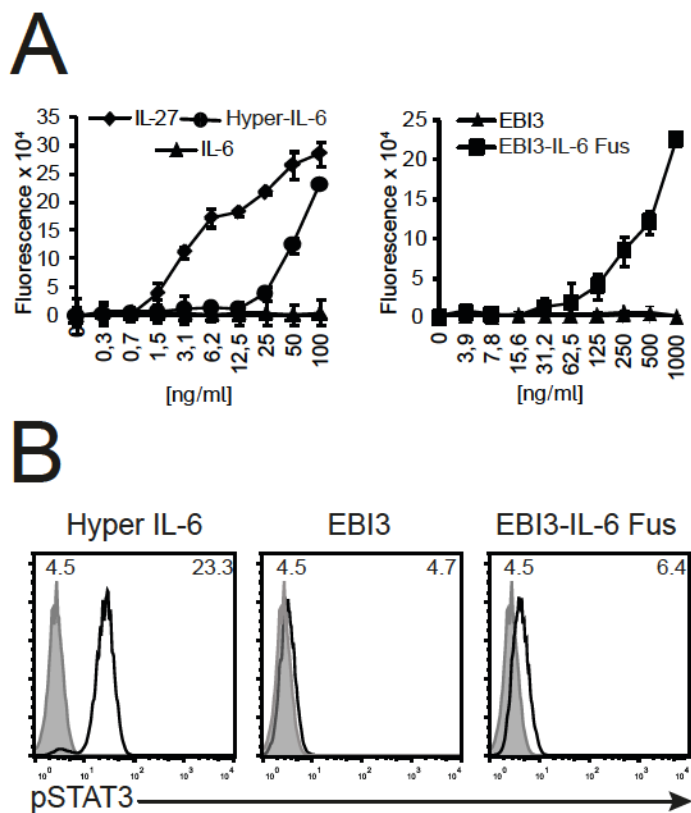


Figure 8

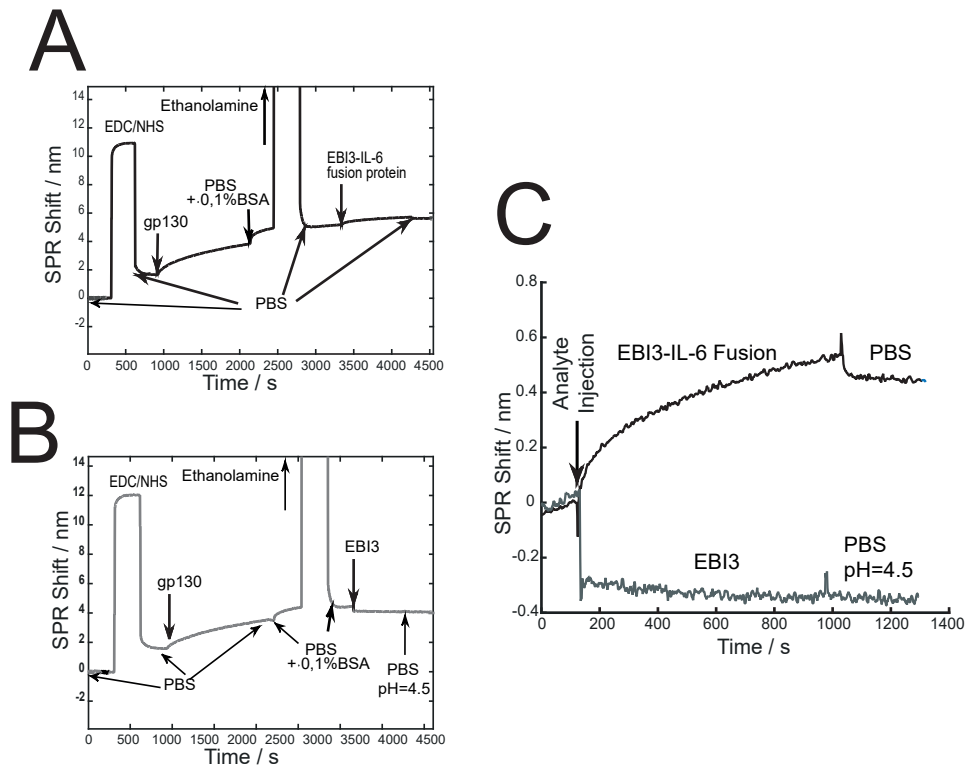
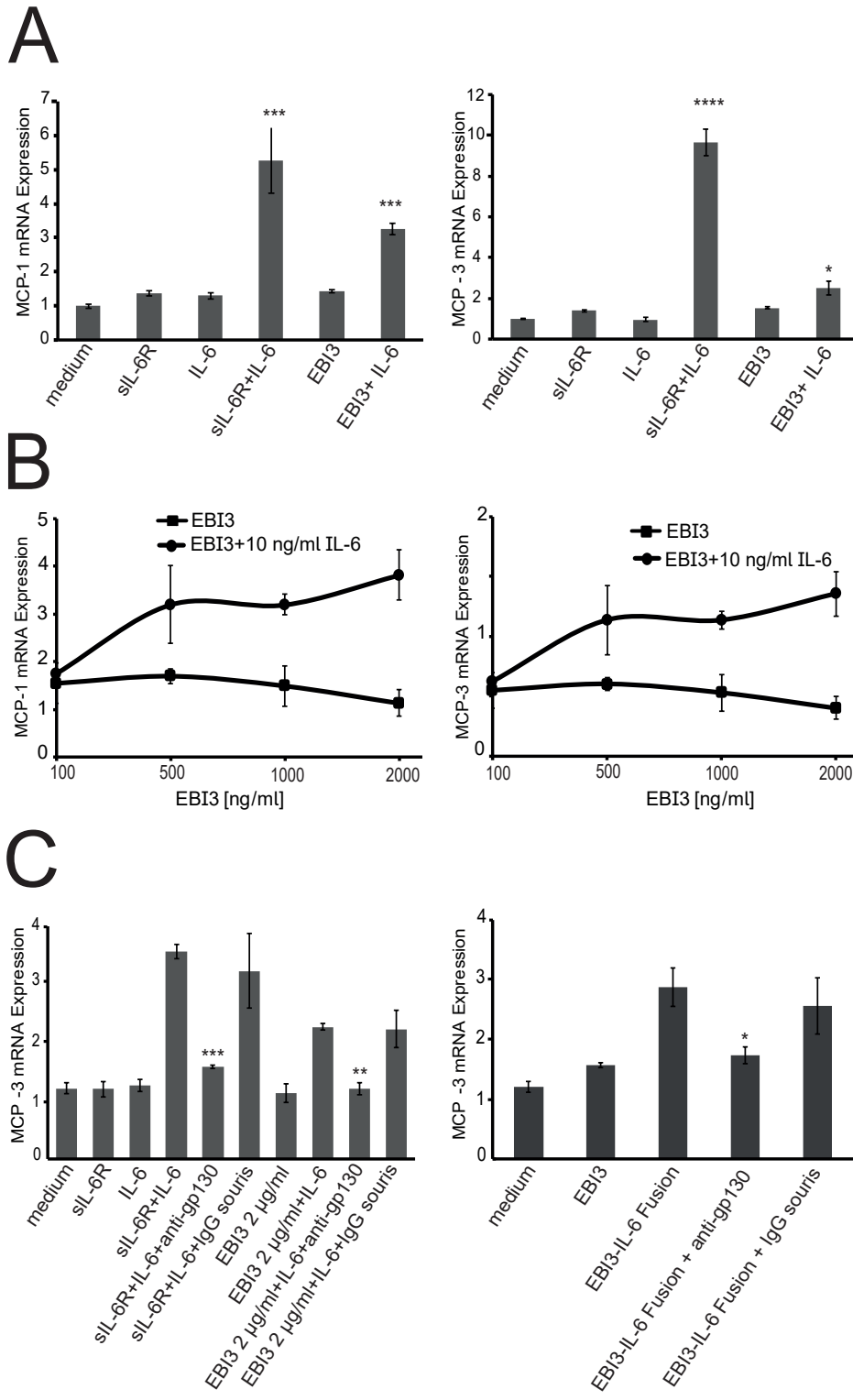




Figure 9



## Chapitre IV : Article 2

### Cardiotrophin-like cytokine (CLCF1), a lipocytokine?

Sarah Pasquin<sup>1,†</sup>, Salma Chehboun<sup>1,†</sup>, Agnieszka Dejda<sup>2</sup>, Yasmine Meliani<sup>1</sup>, Virginia Savin<sup>3</sup>, Gregory, J. Warner<sup>4</sup>, Roger Bosse<sup>4</sup>, Aurélie Tormo<sup>1</sup>, Gaétan Mayer<sup>5</sup>, Mukut Sharma<sup>3</sup>, Przemyslaw Sapieha<sup>2</sup>, Catherine Martel<sup>6</sup> and Jean-François Gauchat<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

<sup>2</sup> Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

<sup>3</sup> Renal Division, KCVA Medical Center, Kansas City, MO 64128-2226, USA

<sup>4</sup> Perkin Elmer, 940 Winter Street, Waltham, MA 02451, USA

<sup>5</sup> Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, QC, H3T 1J4, Canada<sup>¶</sup>

<sup>6</sup> Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

Running title : CLCF1 a lipocytokine?

\*To whom correspondence should be addressed: Dr Jean-François Gauchat, Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Pavillon Roger Gaudry S455/N424, 2900 Édouard Montpetit, Montreal QC, H3T 1J4 Canada. Tel.: 514 343 6111. E-mail:

[jf.gauchat@umontreal.ca](mailto:jf.gauchat@umontreal.ca).

<sup>†</sup>S.P and S.C. contributed equally to this study

**Keywords** : Cardiotrophin-like cytokine, lipoproteins, apolipoprotein E, focal segmental glomerulosclerosis, metabolism, retinopathy, neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor

*Manuscript submitted to "Journal of Molecular and Cell Biology"*

## ABSTRACT

The cytokines CLCF1 and CNTF are ligands for the CNTF receptor and the apolipoprotein E (apoE) receptor sortilin. Both share structural similarities with the N-terminal domain of apoE, known to bind CNTF. We therefore evaluated whether apoE or apoE-containing lipoproteins interact with CLCF1 and regulate its activity. We observed that CLCF1 forms complexes with the three major isoforms of apoE in co-immunoprecipitation and proximity assays. FPLC analysis of mouse and human sera mixed with CLCF1 revealed that CLCF1 co-purifies with plasma lipoproteins. Studies with sera from apoE<sup>-/-</sup> mice indicate that apoE is not required for CLCF1-lipoprotein interactions. VLDL- and LDL-CLCF1 binding was confirmed using proximity and ligand blots assays. CLCF1-induced STAT3 phosphorylation was significantly reduced when the cytokine was complexed with VLDL. Physiological relevance of our findings was asserted in a mouse model of oxygen-induced retinopathy, where the beneficial antiangiogenic properties of CLCF1 were abrogated when co-administrated with VLDL, indicating, that CLCF1 binds purified lipoproteins or lipoproteins in physiological fluids such as serum and behave as a “lipocytokine”. Albeit it is clear that lipoproteins modulate CLCF1 activity, it remains to be determined whether lipoprotein binding directly contributes to its neurotrophic function and its roles in metabolic regulation.

## INTRODUCTION

Cardiotrophin-like cytokine (CLCF1) is an IL-6 family cytokine (Senaldi et al., 1999; Shi et al., 1999) efficiently secreted as a complex with the soluble cytokine receptor cytokine-like factor 1 (CRLF1) (Elson et al., 1998; Herholz et al., 2011). CLCF1 activates the tripartite ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR), comprising CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$  (Elson et al., 2000). CLCF1 and CNTF share signaling pathways (Elson et al., 2000; Lelievre et al., 2001) suggesting that the extensive preclinical and clinical investigations conducted on CNTF might also be indicative of the therapeutic potential of CLCF1. CNTF demonstrated potent neurotrophic activities *in vitro* and in animal models of neurodegenerative diseases, leading to clinical trials in patients suffering from Huntington’s disease, amyotrophic lateral sclerosis and

promising effects in retinal degeneration pathologies (Aebischer et al., 1996; Miller et al., 1996a; Miller et al., 1996b; Bloch et al., 2004; Zhang et al., 2011). Systemic administration of CNTF resulted in unexpected substantial weight loss (Miller et al., 1996a). This observation triggered pre-clinical investigations of CNTF in models of metabolic syndrome. Daily CNTF injections led to long term anorexic effects in diet-induced obese and leptin-deficient mice (Gloaguen et al., 1997; Lambert et al., 2001). CNTF decreased hyperglycemia and hyperinsulinemia suggesting that it could overcome leptin resistance in obese individuals and benefit type II diabetics (Gloaguen et al., 1997; Lambert et al., 2001). The effects of CNTF are believed to be both central and systemic, as CNTFR is expressed in the region of the brain controlling energy balance, in adipose tissues and in skeletal muscle (Helgren et al., 1994; Gloaguen et al., 1997; Zvonic et al., 2003; Watt et al., 2006).

Thanks to these promising preclinical results, a CNTF derivative was tested in clinical trials in which significant weight loss was observed (Ettinger et al., 2003; Bays, 2004), indicating that activation of the CNTFR can regulate food intake and metabolism. The existence of a second CNTFR ligand had been predicted from, i) dramatic differences between the phenotypes of CNTFR and CNTF deficient mice (DeChiara et al., 1995); ii) observations that CNTF is a cytoplasmic cytokine devoid of signal peptide (Stockli et al., 1989; Sendtner et al., 1994); iii) identification of a CNTF-inactivating mutation homozygous in 2-3% of the study population, without observable neuropathology (Takahashi et al., 1994). The role of CLCF1 as a key CNTFR ligand during development is corroborated by similarities in the phenotypes of CLCF1, CRLF1 and CNTFR deficient mice (DeChiara et al., 1995; Alexander et al., 1999; Forger et al., 2003; Zou et al., 2008) and the overlap between the syndromes associated with mutations in *CLCF1*, *CRLF1* and *LIFR $\beta$*  genes (Dagoneau et al., 2004; Dagoneau et al., 2007; Hahn et al., 2010; Herholz et al., 2011). Mutations in *CRLF1* and *CLCF1* genes result in Crisponi (MIM 601378) and cold induced sweating (CISS; MIM 272430 and 610313) syndromes, two rare overlapping recessive conditions (Knappskog et al., 2003; Dagoneau et al., 2007; Hahn et al., 2010; Herholz et al., 2011). Infants with these conditions manifest marked disinterest in food (Knappskog et al., 2003; Dagoneau et al., 2007; Hahn et al., 2010; Herholz et al., 2011) suggesting CLCF1, alike CNTF can regulate food intake. Crisponi syndrome

patients tend to suffer from high grade fever episodes and most die during the first year of life (Hahn et al., 2010; Herholz et al., 2011), supporting a role of CLCF1 in the regulation of metabolism.

Kidney cells express CNTFR (Sleeman et al., 2000). CLCF1 and CRLF1 are detectable in the developing kidney and can induce the development of mature nephron structure *in vitro* (Schmidt-Ott et al., 2005). A urinary system anomaly has been reported in a CISS patient with a mutation in CRLF1 (Aljabari et al., 2013), supporting a role of CLCF1 in kidney development. Our results (McCarthy et al., 2010) suggest an involvement of CLCF1 in focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), the most common primary glomerular cause of renal disease in children and adults (Gbadegesin et al., 2011). Numerous lines of evidence support the presence of a circulating factor in FSGS patient with recurrence (McCarthy et al., 2010). We identified CLCF1 in the serum of FSGS patients and observed that CLCF1 activates the STAT3 signaling in glomeruli and podocytes and induces albuminuria in mice and proteinuria in rats (McCarthy et al., 2010), indicating that this cytokine could represent such factor.

Normal serum comprises components that can inactivate the permeability inducing factor detected in FSGS sera. Fractionation studies of sera from healthy volunteers identified apoE as an anti-permeability factor (Candiano et al., 2001). This suggests that CLCF1 could interact with apoE. In support of this hypothesis, lipoprotein apheresis, a procedure that depletes apoE complexed with lipids (Koizumi et al., 1988), is used as a therapeutic option for steroid-resistant FSGS (Hattori et al., 2003; Kawasaki et al., 2007) and CNTF was shown to interact with apoE *in vitro* (Gutman et al., 1997).

Interestingly, recent studies have demonstrated an association between apoE variants and aberrant lipid metabolism in age-related macular degeneration (Malek et al., 2005; Loane et al., 2010; Sun et al., 2011; Joyal et al., 2016). CNTF is a potent treatment in retinal degeneration pathologies, such as retinitis pigmentosa, underlying a possible interaction between CNTF and apoE containing lipoproteins in the retina (Thanos et al., 2004; Zhang et al., 2011; Kauper et al., 2012; Wen et al., 2012).

We observed that CLCF1, like CNTF (Gutman et al., 1997), binds apoE an important modulator of lipids transport and metabolism. CLCF1, when incubated with serum or purified lipoproteins, participates in lipoprotein-lipid complexes. Formation of complexes with lipoprotein particles changes the biological activity of CLCF1 on CNTFR transfectants and CNTFR expressing cell lines and tissues. This indicates that CLCF1 is likely a “lipocytokine” in serum or cerebrospinal fluid and, that lipoprotein may regulate the neurotrophic and metabolic functions of this cytokine as well as its pathological role in FSGS.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

***Production and purification of recombinant CLCF1***— Mouse or human codon optimized synthetic cDNA (GeneArt™, Thermo Fisher Scientific Inc, Burlington, ON) coding for mature CLCF1 tagged with 6 his and a biotinylated Avitag (Beckett et al., 1999) or 6 his and a Flag (YKDDDDK) epitope were cloned in the expression vector pET24d (Novagen, Millipore Canada Ltd, Etobicoke, ON). The constructs were co-transformed with the BirA biotin-ligase coding vector pBirAcm (Avidity, Aurora, CO) in BL21 (DE3) (ThermoFisher Scientific). Expression was induced as described previously (Cognet et al., 2003) in THY medium supplemented with 12 mg/L biotin, 50 µg/ml kanamycin and 12.5 µg/ml chloramphenicol. Proteins were purified from the bacterial inclusion bodies by immobilized metal affinity chromatography (Crowe et al., 1994). Purifications were performed according to the instructions of the manufacturer (Qiagen Inc, Toronto, ON) using LPS free reagents and detoxified glassware. The recombinant proteins were renatured by dialysis against decreasing concentrations of urea, 100 mM glycine pH 3.5, 1 mM reduced glutathione, 0.1 mM oxidized glutathione followed by 1 mM reduced glutathione, 0.1 mM oxidized glutathione in 4 mM HCl and lastly 4 mM HCl. Purified cytokine was detoxified using polymyxin B-agarose (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) to endotoxin levels below 0.1 EU/µg protein, assessed using a Limulus endotoxin assay (Pierce, ThermoFisher Scientific). Biological activity was measured using Ba/F3 transfected with the cDNA coding for mouse or human gp130, LIFRβ and CNTFRα and an Alamar Blue proliferation assay (Tormo et al., 2012).

***Generation of transfectants co-expressing CLCF1 and apoE***— Synthetic cDNA coding for hCLCF1/hCLRF1, apoE2, 3 and 4 or the combinations of hCLCF1/hCLRF1 modified by the insertion of sequences coding for T2A “self-cleaving peptides” (Szymczak et al., 2004) and the three apoE isoforms were generated using synthetic cDNA (GeneArt™) and standard molecular biology methods (Sambrook, 1989). The mono or multicistronic cDNA were inserted in the expression vector pcDNA™5/FRT vector and stable Flp-In™-293 cells transfectants generated and maintained according the Flp-In™ instruction manual (ThermoFisher Scientific).

***Analysis of CLCF1/apoE interaction by co-immunoprecipitation***— For coimmunoprecipitation assays between recombinant proteins, CLCF1 (200 ng) and apoE 2, 3 or 4 (250 ng; BioVision, Cedarlane, Burlington, ON) were incubated alone or in combination for 16 h in 1 ml Opti-MEM™ (Life Technologies). CLCF1 was immunoprecipitated with 1 µg anti-CLCF1 mAb (R&D systems, Cedarlane, Burlington, ON) and 30 µl protein G agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX). Coimmunoprecipitated proteins were analyzed by Western Blotting (WB) using anti-CLCF1 or anti-apoE mAbs (R&D systems) and horseradish peroxidase (HRP)-labelled secondary Abs.

To analyze CLCF1-apoE interaction in culture medium from Flp-In™ HEK-293 transfectants, cells stably transfected with pcDNA5 containing synthetic cDNAs coding for CLCF1/CRLF1, apoE isotypes, combinations of these proteins or empty pcDNA™5/FRT were expanded to near confluence in DMEM supplemented with fetal calf serum (FCS) and then maintained for 5 days in Opti-MEM™ medium. Culture medium was concentrated 20x by ultrafiltration centrifugation and analyzed for CLCF1 or apoE by WB as described above. One ml concentrated culture medium were incubated with 1 µg rat anti-apoE mAb (R&D systems) and 50 µl anti-rat Ig agarose resin (Sigma- Aldrich). Resin was washed with PBS and elution induced with 70 µl of 100 µM glycine pH 2.5 (glycine buffer). Neutralized eluates were analyzed by WB.

To investigate whether CLCF1 can form a complex with mouse serum apoE, 30  $\mu$ l aliquots of WT or apoE<sup>-/-</sup> mouse serum diluted 1:20 with PBS were incubated with or without 0.3  $\mu$ g biotinylated mouse CLCF1 and 2.5  $\mu$ g rabbit anti-mouse ApoE for 16 h at 4°C. Complexes were immunoprecipitated by adding 50  $\mu$ l anti-rabbit Ig TrueBlot™ beads (Rockland Immunochemicals Inc, Limerick, PA). Beads were washed with 10 vol. PBS and retained proteins eluted with glycine buffer. Eluates were analyzed by WB using HRP-streptavidin (GE-Healthcare Life Science, Cedarlane, Burlington, ON) or rabbit anti-mouse apoE (Abcam Inc, Cedarlane) followed by HRP-labelled TrueBlot™ antirabbit Ab (Rockland Immunochemicals Inc).

To assess whether CLCF1 can form a complex with human serum apoE, 50  $\mu$ l aliquots human serum diluted 1:20 with PBS were incubated with or without 0.5  $\mu$ g biotinylated CLCF1 and 2.5  $\mu$ g rat-anti apoE for 16 h at 4°C. Complexes immunoprecipitated by adding 50  $\mu$ l anti-rat Ig agarose resin were washed with 10 vol. PBS. Glycine buffer eluates were analyze by WB using HRP-streptavidin or rat-anti- ApoE and HRP-labelled anti-rat Ig.

***Analysis of apoE/CLCF1 complexes by fast protein liquid chromatography (FPLC)***

—Aliquots of human, WT mouse or apoE<sup>-/-</sup> mouse serum (50  $\mu$ l) were mixed with 1  $\mu$ g biotinylated human or mouse CLCF1 and fractionated by FPLC using on Superose 6™ HR 10/30 column at the Lipid and Lipid Metabolite Analysis Core Facility (University of Alberta, Edmonton, AB). The 40 FPLC fractions were analyzed for apoE by WB using anti-mouse apoE as described above or biotinylated anti-human apoE (Abcam Inc) and HRP-labelled streptavidin. CLCF1 was detected using HRP-labelled streptavidin.

***Analysis of apoE-CLCF1 interaction by AlphaLISA***— AlphaLISA protein-protein interaction assay was developed to evaluate CLCF1- apoE interaction using streptavidin coated donor beads and anti-rat IgG acceptor beads (Perkin Elmer, Woodbridge, ON). ApoE2, 3 or 4 (0-100 nM) were mixed with CLCF1 (10 nM) in PBS 0.1% BSA for 1 h with rat IgG anti-ApoE (3 nM) (R&D systems, Cedarlane) and anti-rat IgG acceptor beads (10  $\mu$ g/mL). Streptavidin donor beads (40  $\mu$ g/mL) were further added for 1 h protected from light. Fluorescence was



quantified using an Envision multilabel plate reader (Perkin Elmer). The signal without rat IgG antiapoE (background) was subtracted from the data.

The effect of lipid on CLCF1-ApoE interaction was assessed by AlphaLISA protein-protein interaction assay in presence of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3- phosphocholine (DMPC) (0-1000  $\mu$ M). ApoE2, 3, 4 (at 30 nM) were preincubated with increasing concentrations of DMPC for 1 h at 37°C. apoE-DMPC mix were further incubated with CLCF1 (at 10 nM) in PBS 0.1% BSA with rat IgG anti-apoE (3 nM) and anti-rat IgG acceptor beads (10  $\mu$ g/mL). Subsequently, streptavidin donor beads (40  $\mu$ g/ml) were added and incubated for 1 h protected from light. Fluorescence was quantified as described above.

***Lipoprotein biotinylation***— Lipoproteins (HDL, VLDL, LDL, 500  $\mu$ g aliquots; Alpha Aesar, Ward Hill, MA) were biotinylated using a Sulfo-NHS-Biotin Kit (Pierce, ThermoFisher Scientific) for 1 h at 37°C. Biotinylated lipoproteins were separated from free biotin by gel filtration on Sephacryl S-100 (GE Healthcare). Biotinylation was assessed by WB. Lipoproteins were diluted in 50 mM Tris-HCL pH 8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 90 mM NaCl, 50 mg/ml BSA to a final concentration of 50  $\mu$ g/ml for ligand blot experiments.

***Ligand Blot experiments with biotinylated lipoproteins and immobilized CLCF1***— Aliquots of recombinant human CLCF1 (100-200 ng) were subjected to SDS-PAGE and electro-transferred to nitrocellulose membrane. The membranes were blocked in 50 mM Tris-HCL pH 8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 90 mM NaCl, 50 mg/ml BSA and incubated with biotinylated lipoproteins at 50  $\mu$ g/ml for 1 h. Membrane-bound lipoproteins were revealed using HRP-labelled neutravidin (ThermoFisher Scientific). One  $\mu$ g aliquots of LDLR, VLDLR, and SR-B1 (all from Alpha Aesar) were used as positive controls.

***Analysis of lipoproteins-CLCF1 interaction by AlphaLISA***— Lipoproteins-CLCF1 interactions were assessed by AlphaLISA proximity assay using streptavidin-coated donor beads and lipoproteins-conjugated AlphaLISA acceptor beads. For lipoproteins conjugations on acceptor beads, 500  $\mu$ g of unconjugated acceptor beads (Perkin Elmer) were washed in PBS

and centrifuged at 16 000 g for 15 min. The conjugation was performed by mixing the acceptor beads with 50 µg of LDL, HDL or VLDL in 200 µl of 130 mM phosphate buffer pH 8.0 containing 20 mM of NaBH<sub>3</sub>CN. Beads were incubated for 18 h at 37°C, washed twice in 200 µl of 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and stored at 5 mg/mL in 100 mM Tris-HCl 0,01% sodium azide. For the interaction assays, biotinylated CLCF1 (10 nM) was mixed in PBS 0.1% BSA for 1 h with LDL, HDL or VLDL-conjugated acceptor beads (10 µg/mL). Streptavidin donor beads (40 µg/mL) were further added for 1 h protected from light. Fluorescence was quantified using an Envision multilabel plate reader. The signal without CLCF1 (background) was subtracted from the data. The specificity of the signal was assessed by including increasing concentrations of unlabeled CLCF1 (0-1000 nM) in the interaction assay.

***Quantification of CLCF1-induced STAT3 tyrosine phosphorylation by flow cytometry***— CLCF1 (100 ng/ml) was preincubated for 1 h at 37°C with ApoE2, 3 or 4 (10 µg/ml) or purified HDL, LDL and VLDL (100 µg/ml; Alpha Aesar). ARPE-19 retinal pigmented epithelial cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were starved for 24 h, detached and stimulated for 5 min. at 37°C with CLCF1, apoE (10 µg/ml), purified lipoprotein complexes (100 µg/ml) or combinations of these reagents in PBS. Ba/F3 transfectants cells were starved for 4 h and stimulated for 15 min as described for ARPE-19 cells. Cells were fixed, permeabilized and stained with anti-phospho STAT3 (from BD Biosciences, Mississauga, ON or eBioscience, Affimetrix, Cedarlane) as described previously (Crabe et al., 2009; Tormo et al., 2012). Fluorescence was quantified with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

***CLCF1-CNTFR binding assays***— CLCF1 (1 µg/ml) was preincubated for 1 h at 37°C with ApoE2, 3 or 4 (10 µg/ml) or purified HDL, LDL and VLDL (100 µg/ml). Ba/F3 transfectants, IMR32 neuroblastoma cells, or 3T3-L1 fibroblasts were incubated for 1 h on ice in PBS 0.1% BSA alone or supplemented with biotinylated CLCF1 (1 µg/ml), apoE (10 µg/ml), lipoproteins complexes (100 µg/ml) or combinations of these reagents. CLCF1 binding was revealed using PE-labelled streptavidin (1 µg/ml) and flow cytometry (Cognet et al., 2005).

***Oxygen Induced Retinopathy***— All procedures conformed to the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the Animal Ethics Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre. C57BL/6 mice were purchased from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Mouse pups and their fostering mothers (CD1, Charles River) were exposed to 75% O<sub>2</sub> from P7 to P12 and returned to room air (Miloudi et al., 2014). This model serves as a proxy to human ocular neovascular diseases such as diabetic retinopathy, which is characterized by a late phase of destructive pathological angiogenesis (Sapieha et al., 2010; Stahl et al., 2010). Mice were injected intraocularly at P12 with CLCF1 (final intraocular concentration: 100 ng/mL), VLDL (10 µg/mL) or a combination of both. The retinas were dissected at P17, flatten mounted and incubated overnight with fluoresceinated isolectin B4 (1:100) in 1 mM CaCl<sub>2</sub> to determine extent of avascular area or neovascularization area using ImageJ and the SWIFT-neovascularization method (Stahl et al., 2009).

## RESULTS

***CLCF1 forms complexes with apoE2, 3 and 4***— As an initial test to determine whether CLCF1 formed a complex with apoE, we incubated biotinylated CLCF1 with apoE and immunoprecipitated apoE using an anti- CLC mAb. As reported for CNTF (Gutman et al., 1997), co-immunoprecipitation of CLCF1 with the three most common apoE isoforms, apoE2, 3 and 4 could be observed (Figure 1A). We next analyzed whether CLCF1 and apoE form complexes when coexpressed in transfectants. Efficient secretion of CLCF1 by fibroblasts requires coexpression of the soluble cytokine receptor CRLF1 (Elson et al., 2000; Herholz et al., 2011). We therefore generated stable transfectants expressing apoE2, 3 or 4, co-expressing CLCF1 and CRLF1 or co-expressing CLCF1 and CRLF1 with either apoE2, 3 or 4. As expected, apoE2, 3 and 4 or CLCF1 could be detected in the culture medium of the cells transfected with the corresponding cDNA (Figure 1B lower panels). Isolation of apoE2, 3 and 4 from the transfectants culture medium by affinity chromatography using anti-apoE mAb resulted in co-isolation of CLCF1 (Figure 1B upper panels). This confirmed the apoE-CLCF1 interaction (Figure 1A) when apoE2, 3 or 4 was co-incubated with CLCF1 and also indicated that the formation of apoE-CLCF1 complex was not prevented by CRLF1.

To avoid potential competition between exogenous or secreted apoE and fetal bovine serum apoE, these experiments were performed using buffered solutions (Figure 1A) or serum-free cell culture medium (Figure 1B). Serum apoE is involved in transport of bound lipids. The formation of complexes with lipids is believed to strongly affect apoE structure including the four helix NH2 domain that resembles type I cytokines (Hatters et al., 2005; Hatters et al., 2006). We therefore determined whether CLCF1 could also form complexes with serum apoE. We mixed mouse CLCF1 with serum isolated from WT or apoE<sup>-/-</sup> mice and subjected the mixture to immunoaffinity chromatography using anti-mouse apoE mAb. Co-immunoprecipitation of CLCF1 and apoE could be detected (Figure 1C). However, similar immunoaffinity chromatography using a mixture of CLCF1 and apoE deficient mouse serum did not result in coimmunoprecipitation thus ruling out a non-specific isolation of CLCF1 (Figure 1C). As it is unclear whether mouse apoE should be considered as apoE3 or apoE4 subtype (Raffai, 2012; Poirier et al., 2014), we examined whether CLCF1 forms a complex with human serum apoE3 (Figure 1D). As observed with mouse serum, co-immunoprecipitation of human serum apoE and CLCF1 was detected, indicating that formation of the CLCF1-apoE complex could be detected in the presence of serum proteins and lipids (Figure 1D).

***Complexes between apoE2, 3 and 4 and CLCF1 can be detected in solution using an AlphaLISA proximity assay***— We next examined whether the formation of complexes could also be observed in solution using a proximity assay. In this assay biotinylated CLCF1 is used to recruit the streptavidin coated donor beads while the anti-rat IgG acceptor beads are recruited by the anti-apoE mAb/apoE, putative CLCF1 binding partner (Figure 2). A strong energy transfer was detected between the donor and acceptor beads, indicating that interaction between CLCF1 and apoE2, 3 and 4 could be detected in solution at apoE concentrations close to physiological levels (5-8 mg/dl) (Figure 2A). The observed signal was more than 10x higher than the background energy transfer in the absence of CLCF1, apoE or anti-apoE mAb, indicating that it was induced by the formation of CLCF1-apoE-anti-apoE complexes (Figure 2A).

***ApoE increases the biological activity of CLCF1***—Next, we determined whether apoE could modify CNTFR recruitment and activation using Ba/F3 transfectants expressing the tripartite CNTFR (Elson et al., 2000). Interestingly, while the binding of biotinylated CLCF1 was slightly decreased in the presence of apoE3 (Figure 3A), CLCF1-induced STAT3 phosphorylation was increased in the presence of apoE3 (Figure 3B).

***CLCF1-apoE complexes are not disrupted by lipids***— Having shown that CLCF1-apoE can be detected in solution using the AlphaLISA proximity assay (Figure 2A), we used this approach to assess the effect of lipid-induced change in apoE structure on the interaction between CLCF1 and apoE. While our data on co-immunoprecipitation between serum apoE and CLCF1 suggest that apoE can interact with CLCF1 in the presence of lipids, the formation of complex between lipid-free apoE and the cytokine could not be excluded. Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) is extensively used as a model lipid that binds and induces apoE conformation changes (Hatters et al., 2005). We therefore investigated the effect of DMPC on CLCF1-ApoE3 interaction. Preincubation of apoE with DMPC at concentration previously used to alter apoE four  $\alpha$ -helix NH2 domain structure (Hatters et al., 2005) markedly increased the proximity assay signal (Figure 2B), indicating that lipid-bound apoE, which is believed to represent the bulk of extracellular apoE, can still form a complex with CLCF1. Interestingly, the interaction between the predominant apoE isotype, apoE3, and CLCF1 was more sensitive to the effect of DMPC than apoE2-CLCF1 or apoE4-CLCF1 according to the proximity assay signal (Figure 2B).

***CLCF1 co-purifies/co-elutes with apoE-containing lipoprotein complexes***— This observation prompted us to examine whether CLCF1 participated in apoE containing lipoprotein complexes. We therefore subjected CLCF1 mixed with mouse or human serum to FPLC. This approach is widely used to analyze lipoprotein complexes (de Silva et al., 1994). CLCF1 was detected in the apoE containing fractions suggesting that the two proteins form complexes (Figure 4A and B). No CLCF1 could be revealed in the fractions containing free proteins or small size protein complexes, indicating that CLCF1 is mainly bound to large size, presumably lipoprotein complexes. This is further supported by the data obtained when CLCF1 was mixed

with sera from apoE<sup>-/-</sup> mice. The lipoprotein elution profile is modified in these mice i.e. the proportion of VLDL, IDL and LDL is markedly increased while that of HDL is decreased (Jawien et al., 2004). Although the CLCF1 elution profile was altered (Figure 4C), CLCF1 remained in lipoprotein fractions. This suggests that CLCF1 can interact with lipoprotein complexes independent of ApoE and that it represents a “lipocytokine”.

***CLCF1 binds VLDL and LDL***— To test whether CLCF1 can bind lipoproteins we used a ligand blotting approach used to detect LDL receptors (Wade et al., 1985). CLCF1 was subjected to SDS/PAGE under non-reducing conditions, transferred to nitrocellulose and incubated with biotinylated LDL, HDL or VLDL (Figure 5A). A clear signal was detected when CLCF1 monomers and multimers were incubated with VLDL and LDL while no signal could be observed with BSA, used as a specificity control or when CLCF1 was incubated only with the reagent used to detect biotinylated lipoproteins (Figure 5A left panel). A very faint signal was observed with HDL.

To confirm CLCF1-lipoprotein interactions, we performed AlphaLISA proximity assays between biotinylated CLCF1 (to recruit streptavidin coated donor beads) and VLDL, LDL or HDL covalently conjugated to acceptor beads. Strong fluorescent signals were obtained when CLCF1 was mixed with LDL and VLDL (Figure 5B). As observed with the ligand blot assays, no clear positive signals were detected when the proximity assay was performed using HDL-conjugated beads (Figure 5B). To assess the specificity of the signal, we carried out competition experiments by adding increasing amount of unlabeled CLCF1 to protein-protein interactions assays. As expected, the presence of unlabeled CLCF1 decreased biotinylated CLCF1-LDL and CLCF1-VLDL proximity assay signal indicating that the latter was specific (Supplementary Figure S1). No competition was observed for the very low CLCF1-HDL signal suggesting that it was nonspecific. These results indicate that CLCF1 can efficiently participate to form complexes with LDL and VLDL lipoproteins.

***Lipoproteins modify CLCF1 binding to CNTFR-expressing transfectants and cell lines***— Next, we investigated whether the formation of CLCF1-lipoprotein complex influences the binding of CLCF1 to Ba/F3 transfectants expressing the tripartite CNTFR (CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$ ). When Ba/F3 cells were incubated with biotinylated CLCF1 in the presence of HDL or LDL, the binding of the cytokine was not significantly modified (Figure 6A). Inclusion of VLDL markedly enhanced CLCF1 binding to the CNTFR transfectants (Figure 6A). To exclude possibility that the VLDL-effect is linked to a characteristic of the Ba/F3 pro-B cell line, we investigated the effect of the lipoproteins on the binding of CLCF1 to IMR-32 human neuroblastoma cells or the 3T3-L1 mouse pre-adipocytes both expressing CNTFR (Elson et al., 2000; Zvonic et al., 2003). As observed with the Ba/F3 CNTFR, the presence of VLDL strongly increases the binding to the CNTFR expressing cells (Figure 6B and C). No CLCF1 binding could be detected on Ba/F3 expressing LIFR $\beta$  in the presence or absence of lipoproteins (data not shown).

***CLCF1 activity is modified by HDL, LDL and VLDL***— We next used CNTFR expressing Ba/F3 transfectants to evaluate whether binding to lipoprotein would modify the activity of CLCF1. We analyzed the activation of the CNTFR signaling pathways by phospho-specific flow cytometry (Krutzik et al., 2005). CLCF1 did not induce a significant change of STAT3 phosphorylation in Ba/F3 cells when HDL or LDL concentration in the medium was close to serum levels (Conference on Health Effects of Blood Lipids--Optimal Distributions for et al., 1980) (Figure 7A). Inclusion of VLDL sharply reduced CLCF1-induced signaling (Figure 7A). Time-course experiments indicated that the signaling reduction observed at 15 min in the presence of VLDL was not due to a delay in STAT3 activation (Figure 7C).

In preclinical mouse models of retinopathy, activation of the JAK-STAT3 pathway by the CNTFR ligand CNTF was shown to be therapeutically beneficial in blocking pathological neovascularization and led to CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implant as an established treatment for retinitis pigmentosa and macular telangiectasia (Thanos et al., 2004; Zhang et al., 2011; Kauper et al., 2012; Wen et al., 2012). We therefore tested the capacity of VLDL to inhibit CLCF1-induced STAT3 phosphorylation in ARPE-19 retinal epithelial cell

line cultures. As observed with Ba/F3 transfectants, inclusion of VLDL markedly attenuated the CLCF1-induced phosphorylation of STAT3 (Figure 7B). Altogether, our results indicate that VLDL, while increasing CLCF1 binding to its receptor, decreased the capacity of the CLCF1 receptor complexes to activate the JAK-STAT3 signaling pathway. Our results indicate that lipoproteins bind and regulate CLCF1 activity, suggesting that variation of the ratio between the different lipoproteins in serum or other body fluids could control the neurotrophic, metabolic and immunoregulatory functions of CLCF1.

***CLCF1 in oxygen induced retinopathy***— In order to investigate the relevance of our findings *in vivo*, we interrogated on the ability of CLCF1 to inhibit angiogenesis in a mouse model of oxygen induced retinopathy that is widely used to study pathological neovascularization in the retina (Smith et al., 1994). Mouse pups are placed in 75% O<sub>2</sub> from postnatal day 7 to 12 to induce vascular degeneration and then returned to room air for 5 days. This model mimics retinopathy of prematurity and serves as a proxy for the angiogenic phase of proliferative diabetic retinopathy (Miloudi et al., 2014). Intraocular injection of CLCF1 or VLDL individually significantly augmented vascular regeneration (Figure 8 A and C) and reduced pathological pre-retinal neovascularization (Figure 8B & D) as determined at postnatal day 17. These findings are similar to those recently reported by Bucher and colleagues for CNTF alone (Bucher et al., 2016). Interestingly, injections of the CLCF1- VLDL complex did not result in additive beneficial effect, compared with VLDL alone, suggesting that VLDL prevents the effect of CLCF1 and that the biological activity of CLCF1 can be regulated by lipoproteins *in vivo* (Figure 8).

## **DISCUSSION**

CLCF1 is a potent neurotrophic factor with the ability to activate the tripartite CNTFR. Symptoms associated with mutations in the genes coding for CLCF1 or its binding partner CRLF1 suggest that this cytokine could regulate metabolism and food intake. In this study we observed that CLCF1, alike CNTF, forms complexes with apoE, an important regulator of lipids transport and lipid metabolism. These complexes could be detected when the two binding



partners were mixed or co-expressed using mouse or human proteins. CLCF1 also formed complexes with the three most common apoE isotypes (apoE2, 3 and 4). The formation of apoE complexes was not prevented by coexpression with the soluble cytokine receptor CRLF1 that is necessary for efficient secretion of CLCF1 and recently shown to participate in CNTFR activation (Larsen et al., 2010; Larsen et al., 2016). CLCF1-apoE complexes could be observed using complementary approaches based on unrelated principles: co-immunoprecipitation, chromatography or proximity assays. The formation of apoE-CLCF1 complexes was increased in presence of DMPC, a compound known to bind apoE and previously used to investigate the lipid-induced changes of apoE conformation (Hatters et al., 2005). This together with the observation that CLCF1 interacts with apoE in lipid-containing serum indicates that CLCF1 is likely to bind apoE in circulation. CLCF1-apoE complexes could also be present in the central nervous system where apoE plays a key role in lipid transport and regulation of neural function. CLCF1 has neuroprotective role during development in mouse models (Zou et al., 2008). Interestingly, considering the high physiological concentration of apoE in serum and cerebrospinal fluids, CLCF1 is expected to play its exocrine functions in an apoE-complexed form. In support of this notion, no CLCF1 could be detected in the small protein fraction of mouse and human serum. While apoE binds CLCF1, fractionation of apoE-deficient mouse sera mixed with this cytokine indicates that apoE is not required for the interaction of CLCF1 with lipoproteins. Further analysis revealed that CLCF1 binds with different plasma lipoproteins (LDL and VLDL). Thus, these results provide a strong rationale to consider CLCF1 as a “lipocytokine” and to pursue the investigation of its functions and pharmacology in lipid-complexed forms.

In line with its capacity to bind lipoprotein, CLCF1 has been shown to bind with high affinity to two lipoprotein receptors, sortilin and the sortilin-related multi-ligand receptor sorLA (Larsen et al., 2010; Larsen et al., 2016). It will be of interest to evaluate whether CLCF1-lipoprotein complexes mediate specific functions through these receptors and whether lipoproteins modify CLCF1 pharmacology by targeting the cytokine to cells expressing sortilin, sorLA or other lipoprotein receptors.

CLCF1 is a regulator of kidney development, of glomerular function and is believed to be a permeability factor implicated in the development and recurrence of the progressive renal disease FSGS (McCarthy et al., 2010). Interestingly, depletion of lipoproteins by plasmapheresis is successfully used in treating FSGS and preventing kidney graft loss (Larsen et al., 2010; Larsen et al., 2016). Therefore, we suggest, that CLCF1 could be the critical factor that is removed from the patients' circulation during plasmapheresis. Future investigation on the regulatory role of apoE and lipoproteins on the glomerular effect of CLCF1 might open new therapeutic approaches to treat FSGS.

We investigated the effect of apoE and lipoproteins on CLCF1 biological activity through CNTFR. These experiments were significantly complicated by the fact that most biological assays are carried out in the presence of serum that contain lipoproteins. We found that addition of lipoproteins in proliferation assays strongly modified the background response even when we used delipidated serum or serum-free media, and prevented interpretation of the results (data not shown). Therefore, our experiments focused on signalling assays that could be performed in serum-free solutions and condition in which lipoprotein alone had no effect on the signalling cascade investigated. Data obtained regarding STAT3 phosphorylation, a key CNTFR signalling molecule activated by CLCF1 (Elson et al., 2000; Lelievre et al., 2001) indicate a significant modulation of the biological activity of CLCF1 by lipoproteins. Similar results were obtained with CNTFR transfectants and cell line constitutively expressing CNTFR. Intriguingly, HDL-CLCF1 and LDL-CLCF1 complexes induced a slight but not significant increase of STAT3 phosphorylation *in vitro* compared to CLCF1 alone. The most striking effects were observed with VLDL: addition of this type of lipoprotein strongly reduced the induction of STAT3 phosphorylation by CLCF1. As VLDL did not inhibit CLCF1-CNTFR binding, this suggests that the binding of CLCF1 on VLDL interferes with the recruitment or the heterodimerization of the signaling chain LIFR $\beta$  and gp130. This prompted us to study the effect of VLDL in an *in vivo* assay in which activation of the CNTFR might be relevant for preclinical studies. Intraocular injection of either VLDL or CLCF1 in a mouse model of oxygen-induced retinopathy showed a beneficial effect on both retinal neovascularization and vaso-obliteration. No differences could be detected between VLDL alone and CLCF1 plus VLDL

suggesting that the effect of CLCF1 is prevented by VLDL *per se*. Altogether, these results suggest that the cholesterolemic profile, (i.e. the concentration and the ratio between the different lipoproteins) could directly influence the biological activities of CLCF1 in functions such as neuron survival, immune response and metabolism. It would be of interest to investigate whether a disruption or an imbalance of CLCF1 activity regulation by lipoproteins could contribute to the deleterious effects observed in FSGS patients and whether recombinant apoE or synthetic lipoprotein complexes could be beneficial in this pathology.

While our study focused on CLCF1, this cytokine shares biological activities and biochemical properties with other cytokines that may also interact with lipoproteins. Our results provide novel insight on lipoproteins and type 1 cytokine interactions and suggest that apolipoprotein- or lipoprotein-cytokine complexes could be used to modify the therapeutic properties of recombinant cytokines.

### **Authors contribution**

P. S. designed and performed AlphaLISA experiments, proliferations, binding and STAT3 phosphorylation assays, analyzed data and wrote the paper. C.S. designed and performed co-immunoprecipitation assays, the ligand blotting experiments and the WB assays on the FPLC-fractionated serum. D.A. designed and performed all intraocular injections in mice model of retinopathy and generated and analyzed the corresponding data. M.Y. did the preliminary experiments for the CLCF1-apoE coimmunoprecipitations. Gauchat, J.F. conceived and supervised the project, analyzed data and wrote the paper. All authors contributed to the conception of the study, the analysis of the data and the revision of the manuscript.

### **Acknowledgments**

We are very grateful to Prof. Dr. Jürgen Scheller (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Germany) for the kind gift of hCNTFR-expressing Ba/F3 cells. We thank the Institute for Research in Immunology and

Cancer (IRIC) genomic platform for the DNA sequencing as well as Dr. Sebastien Guiral and Dr. Jean Duchaine from the IRIC HTS core facility for the AlphaLISA signal measurements. We are grateful to Mr. Audric Moses (Lipid and Lipid Metabolite Analysis Core Facility, University of Alberta) for the FPLC fractionations.

### **Funding**

This work was supported by The Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-57832 to J.F.G. S.P. was supported by a fellowship from the Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship-Masters (CIHR), and a doctoral scholarship from the Fond de Recherche Santé Québec (FRQS).

## REFERENCES

- Aebischer, P., Schluep, M., Deglon, N., et al. (1996). Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2, 696-699.
- Alexander, W.S., Rakar, S., Robb, L., et al. (1999). Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* 9, 605-608.
- Aljabari, S., Howard, E., Bell, T., et al. (2013). Cold induced sweating syndrome with urinary system anomaly association. *Case reports in pediatrics* 2013, 173890.
- Bays, H.E. (2004). Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res* 12, 1197-1211.
- Beckett, D., Kovaleva, E., and Schatz, P.J. (1999). A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* 8, 921-929.
- Bloch, J., Bachoud-Levi, A.C., Deglon, N., et al. (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.
- Bucher, F., Walz, J.M., Buhler, A., et al. (2016). CNTF Attenuates Vasoproliferative Changes Through Upregulation of SOCS3 in a Mouse-Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 4017-4026.
- Candiano, G., Musante, L., Carraro, M., et al. (2001). Apolipoproteins prevent glomerular albumin permeability induced in vitro by serum from patients with focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 12, 143-150.
- Cognet, I., de Coignac, A.B., Magistrelli, G., et al. (2003). Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of Escherichia coli BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation. *J Immunol Methods* 272, 199-210.
- Cognet, I., Guilhot, F., Gabriac, M., et al. (2005). Cardiotrophin-like cytokine labelling using Bir A biotin ligase: a sensitive tool to study receptor expression by immune and non-immune cells. *J Immunol Methods* 301, 53-65.
- Conference on Health Effects of Blood Lipids--Optimal Distributions for, P., Wynder, E.L., and American Health, F. (1980). Plasma lipids : optimal levels for health.
- Crabe, S., Guay-Giroux, A., Tormo, A.J., et al. (2009). The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling. *J Immunol* 183, 7692-7702.
- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., et al. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31, 371-387.
- Dagoneau, N., Bellais, S., Blanchet, P., et al. (2007). Mutations in cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) account for both Crisponi and cold-induced sweating syndromes. *Am J Hum Genet* 80, 966-970.
- Dagoneau, N., Scheffer, D., Huber, C., et al. (2004). Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *Am J Hum Genet* 74, 298-305.
- de Silva, H.V., Mas-Oliva, J., Taylor, J.M., et al. (1994). Identification of apolipoprotein B-100 low density lipoproteins, apolipoprotein B-48 remnants, and apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in the mouse. *Journal of lipid research* 35, 1297-1310.

- DeChiara, T.M., Vejsada, R., Poueymirou, W.T., et al. (1995). Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83, 313-322.
- Elson, G.C., Graber, P., Losberger, C., et al. (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.
- Elson, G.C., Lelievre, E., Guillet, C., et al. (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 3, 867-872.
- Ettinger, M.P., Littlejohn, T.W., Schwartz, S.L., et al. (2003). Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *Jama* 289, 1826-1832.
- Forger, N.G., Prevette, D., deLapeyriere, O., et al. (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.
- Gbadegesin, R., Lavin, P., Foreman, J., et al. (2011). Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update. *Pediatric nephrology* 26, 1001-1015.
- Gloaguen, I., Costa, P., Demartis, A., et al. (1997). Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6456-6461.
- Gutman, C.R., Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., et al. (1997). Apolipoprotein E binds to and potentiates the biological activity of ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci* 17, 6114-6121.
- Hahn, A.F., Waaler, P.E., Kvistad, P.H., et al. (2010). Cold-induced sweating syndrome: CISS1 and CISS2: manifestations from infancy to adulthood. Four new cases. *J Neurol Sci* 293, 68-75.
- Hatters, D.M., Budamagunta, M.S., Voss, J.C., et al. (2005). Modulation of apolipoprotein E structure by domain interaction: differences in lipid-bound and lipid-free forms. *J Biol Chem* 280, 34288-34295.
- Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., and Weisgraber, K.H. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci* 31, 445-454.
- Hattori, M., Chikamoto, H., Akioka, Y., et al. (2003). A combined low-density lipoprotein apheresis and prednisone therapy for steroid-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis in children. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 42, 1121-1130.
- Helgren, M.E., Squinto, S.P., Davis, H.L., et al. (1994). Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 76, 493-504.
- Herholz, J., Meloni, A., Marongiu, M., et al. (2011). Differential secretion of the mutated protein is a major component affecting phenotypic severity in CRLF1-associated disorders. *Eur J Hum Genet* 19, 525-533.
- Jawien, J., Nastalek, P., and Korb, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 55, 503-517.
- Joyal, J.S., Sun, Y., Gantner, M.L., et al. (2016). Retinal lipid and glucose metabolism dictates angiogenesis through the lipid sensor Ffar1. *Nat Med* 22, 439-445.

- Kauper, K., McGovern, C., Sherman, S., et al. (2012). Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 7484-7491.
- Kawasaki, Y., Suzuki, S., Matsumoto, A., et al. (2007). Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis for focal and segmental glomerulosclerosis. *Pediatric nephrology* 22, 889-892.
- Knappskog, P.M., Majewski, J., Livneh, A., et al. (2003). Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *Am J Hum Genet* 72, 375-383.
- Koizumi, J., Inazu, A., Fujita, H., et al. (1988). Removal of apolipoprotein E-enriched high density lipoprotein by LDL-apheresis in familial hypercholesterolaemia: a possible activation of the reverse cholesterol transport system. *Atherosclerosis* 74, 1-8.
- Krutzik, P.O., Hale, M.B., and Nolan, G.P. (2005). Characterization of the murine immunological signaling network with phosphospecific flow cytometry. *J Immunol* 175, 2366-2373.
- Lambert, P.D., Anderson, K.D., Sleeman, M.W., et al. (2001). Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4652-4657.
- Larsen, J.V., Hansen, M., Moller, B., et al. (2010). Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol Cell Biol* 30, 4175-4187.
- Larsen, J.V., Kristensen, A.M., Pallesen, L.T., et al. (2016). Cytokine-Like Factor 1, an Essential Facilitator of Cardiotrophin-Like Cytokine:Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alpha Signaling and sorLA-Mediated Turnover. *Mol Cell Biol* 36, 1272-1286.
- Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., et al. (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.
- Loane, E., McKay, G.J., Nolan, J.M., et al. (2010). Apolipoprotein E genotype is associated with macular pigment optical density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2636-2643.
- Malek, G., Johnson, L.V., Mace, B.E., et al. (2005). Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11900-11905.
- McCarthy, E.T., Sharma, M., and Savin, V.J. (2010). Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 5, 2115-2121.
- Miller, R.G., Bryan, W.W., Dietz, M.A., et al. (1996a). Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47, 1329-1331.
- Miller, R.G., Petajan, J.H., Bryan, W.W., et al. (1996b). A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* 39, 256-260.
- Miloudi, K., Dejda, A., Binet, F., et al. (2014). Assessment of vascular regeneration in the CNS using the mouse retina. *J Vis Exp*, e51351.

- Poirier, J., Miron, J., Picard, C., et al. (2014). Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 35S2, S3-S10.
- Raffai, R.L. (2012). Apolipoprotein E regulation of myeloid cell plasticity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 23, 471-478.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Second edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapieha, P., Joyal, J.S., Rivera, J.C., et al. (2010). Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest* 120, 3022-3032.
- Schmidt-Ott, K.M., Yang, J., Chen, X., et al. (2005). Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *J Am Soc Nephrol* 16, 1993-2002.
- Senaldi, G., Varnum, B.C., Sarmiento, U., et al. (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.
- Sendtner, M., Carroll, P., Holtmann, B., et al. (1994). Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 25, 1436-1453.
- Shi, Y., Wang, W., Yourey, P.A., et al. (1999). Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 132-138.
- Sleeman, M.W., Anderson, K.D., Lambert, P.D., et al. (2000). The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 74, 265-272.
- Smith, L.E., Wesolowski, E., McLellan, A., et al. (1994). Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 101-111.
- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., et al. (2010). The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2813-2826.
- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., et al. (2009). Computer-aided quantification of retinal neovascularization. *Angiogenesis* 12, 297-301.
- Stockli, K.A., Lottspeich, F., Sendtner, M., et al. (1989). Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342, 920-923.
- Sun, E., Lim, A., Liu, X., et al. (2011). Apolipoprotein E gene and age-related macular degeneration in a Chinese population. *Mol Vis* 17, 997-1002.
- Szymczak, A.L., Workman, C.J., Wang, Y., et al. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 22, 589-594.
- Takahashi, R., Yokoji, H., Misawa, H., et al. (1994). A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet* 7, 79-84.
- Thanos, C.G., Bell, W.J., O'Rourke, P., et al. (2004). Sustained secretion of ciliary neurotrophic factor to the vitreous, using the encapsulated cell therapy-based NT-501 intraocular device. *Tissue Eng* 10, 1617-1622.
- Tormo, A.J., Letellier, M.C., Lissilaa, R., et al. (2012). The cytokines cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 (CLC/CLF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) differ in their receptor specificities. *Cytokine*.
- Wade, D.P., Knight, B.L., and Soutar, A.K. (1985). Detection of the low-density-lipoprotein receptor with biotin-low-density lipoprotein. A rapid new method for ligand blotting. *The Biochemical journal* 229, 785-790.



- Watt, M.J., Dzamko, N., Thomas, W.G., et al. (2006). CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* 12, 541-548.
- Wen, R., Tao, W., Li, Y., et al. (2012). CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res* 31, 136-151.
- Zhang, K., Hopkins, J.J., Heier, J.S., et al. (2011). Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6241-6245.
- Zou, X., Bolon, B., Pretorius, J., et al. (2008). Neonatal Death in Mice Lacking Cardiotrophin-Like Cytokine (CLC) is Associated with Multifocal Neuronal Hypoplasia. *Veterinary pathology*.
- Zvonic, S., Cornelius, P., Stewart, W.C., et al. (2003). The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J Biol Chem* 278, 2228-2235.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1. CLCF1 binds recombinant and serum apoE.** (A) Recombinant CLCF1 (200 ng) and apoE2, 3 or 4 (250 ng) were incubated alone or in combination for 16 h. The samples were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-CLCF1 and protein G agarose. Immunoprecipitated proteins were analyzed by WB using mAbs specific for apoE (upper panel) or CLCF1 (lower panel). Lanes “CLCF1 2 ng” and “apoE3 20 ng”, show results of recombinant proteins directly subjected to SDS-PAGE and WB blot analysis. (B) CLCF1 and apoE form a complex when co-expressed in HEK-293 cells. The cell culture medium from stable transfectants expressing the indicated proteins in combination with CLCF1 or from cells transfected with empty expression vector (lane D5) was subjected to immunoaffinity chromatography with rat-anti-human apoE and anti-rat Ig Agarose. The eluates were analysed by WB using anti-apoE or anti-CLCF1 mAbs (upper panels). Supernatants of the stable transfectants were analyzed for the presence of apoE or CLCF1 by WB (lower panels). (C and D) CLCF1 binds mouse and human serum apoE. (C) Mouse serum samples isolated from WT or apoE<sup>-/-</sup> mice were diluted 1:20, mixed with biotinylated mouse CLCF1 and the complexes immunoprecipitated with rabbit anti-mouse apoE and anti-rabbit Ig agarose. The eluates were analysed for apoE or CLCF1 by WB using anti-mouse apoE or HRP-labelled streptavidin. The last two lanes show the signals obtained with 40 ng of biotinylated mouse CLCF1 or apoE included as control. (D) Human serum samples were diluted 1:20, mixed with biotinylated human CLCF1 and the complexes immunoprecipitated with rat anti-apoE and anti-rat Ig agarose. The eluates were analyzed for apoE or CLCF1 by WB using anti-apoE or HRP-labelled

streptavidin. The last two lanes show the signals obtained with 40 ng of biotinylated human CLCF1 or apoE included as control. CLCF1 was abbreviated as CLCF1 in all figures.

**FIGURE 2. AlphaLISA proximity assay shows CLCF1-apoE complex formation that is increased by the lipid DMPC.** (A) apoE2, 3 or 4 were mixed with CLCF1 (10 nM) in PBS 0.1% BSA for 1h with IgG rat anti-ApoE (3 nM) and anti-IgG rat acceptor beads (10 µg/mL). Streptavidin donor beads (40 µg/mL) were further added for 1h and 615 nM fluorescence signal assessed. (B) The indicated apoE isotypes (30 nM) were mixed at 37°C with increasing amount of DMPC for 1h. apoE-DMPC mix were further incubated with CLCF1 and subjected to AlphaLISA proximity assay as described in (A).

**FIGURE 3. ApoE3 increases CLCF1-induced CNTFR activation.** (A) Ba/F3 transfected with CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$  cDNA were successively incubated with mouse biotinylated CLCF1 (1 µg/ml) alone or in the presence of apoE3 (10 mg/ml) and PE-labelled streptavidin and fluorescence was assessed by flow cytometry. Vehicle: cells incubated with PE-streptavidin alone. (B) Ba/F3-CNTFR were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) or apoE3 (10 mg/ml) alone or in combination for 15 min. STAT3 tyrosine phosphorylation was assessed by intracellular staining with anti-pSTAT3 mAb and flowcytometry. Vehicle: cells incubated with PE-streptavidin alone.

**FIGURE 4. CLCF1 co-purifies or co-elutes with serum lipoprotein complexes.** (A) WT mouse, (B) human or (C) apoE<sup>-/-</sup> mouse sera were mixed with corresponding biotinylated CLCF1. The mixtures were fractionated by FPLC using a Superose 6 HR 10/ column in order to obtain 40 fractions. The fractions were analyzed for ApoE or CLCF1 by WB using anti-apoE or HRP-labelled streptavidin. The right lanes show the signals obtained with 40 ng of apoE or biotinylated CLCF1 or apoE included as control.

**FIGURE 5. Biotinylated LDL and VLDL bind CLCF1.** (A) Interaction between CLCF1 and lipoproteins was assessed using ligand blotting assays: 0.1-0.2  $\mu\text{g}$  of hCLCF1, or 1  $\mu\text{g}$  of BSA were subjected to non-reducing SDS-PAGE. Proteins were revealed by Coomassie blue staining (left section) or electro-transferred to nitrocellulose and incubated successively with 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  biotinylated VLDL, LDL or HDL and HRP-labeled neutravidin (middle 3 panels). Signal was revealed by chemiluminescence. Image in the far right section shows results of incubation with HRP-labeled neutravidin alone. Lane hCLCF1 biot; 40 ng of biotinylated CLCF1 was used as positive control for neutravidin detection. (B) The formation of LDL and VLDL complexes can be detected using an AlphaLISA proximity assay. Biotinylated hCLCF1 was mixed with LDL, HDL and VLDL covalently coupled to acceptor beads (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Streptavidin donor beads (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were further added for 1h and 615 nM fluorescence signal assessed.

**FIGURE 6. VLDL increases CLCF1 binding to CNTFR-expressing cells.** Ba/F3 transfected with CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$  cDNA, IMR32 neuroblastoma or 3T3-L1 pre-adipocytes were successively incubated with species-matched biotinylated CLCF1 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) alone or in the presence of LDL, HDL or VLDL (all at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cells were then incubated with PE-conjugated streptavidin and fluorescence was assessed by flow cytometry. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples. Vehicle: cells incubated with PE-streptavidin alone.

**FIGURE 7. Lipoproteins modulate CLCF1-induced STAT3 tyrosine phosphorylation.** (A) Ba/F3 transfected CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$  cDNA were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) or lipoproteins (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) alone or in combinations for 15 min. (B) ARPE-19 retinal epithelial cells were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) or lipoproteins (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) alone or in combinations for 5 min. (C) Ba/F3-CNTFR were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) or lipoproteins (100 mg/ml) alone or in combinations for 5-30 min. STAT3 tyrosine phosphorylation was assessed by intracellular staining with anti-pSTAT3 mAb and flow cytometry. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples. Vehicle: unstimulated cells.

**FIGURE 8. Treatment with CLCF1 or VLDL efficiently decreased oxygen-induced pathological neovascularization.** C57BL/6 WT mice were subjected to OIR and injected intravitreally at P12 with CLCF1 (intravitreal concentration 100 ng/mL), VLDL (intravitreal concentration 10 µg/mL), a combination of CLCF1 and VLDL or vehicle. Results are expressed as percentage of (A) vaso-obiterated or (B) neovascular area versus the whole retinal area. Histograms bars represent mean value of percentage, and dots represent individual values. (C) Representative retinal flatmount images are shown in with vaso-obiterated areas delimited with dotted line. (D) Representative retinal flatmount images are shown with pre-retinal neovascularization outlined. Scale bars: 500µm.

### **Supplementary figure legend**

**FIGURE S1. VLDL-CLCF1 and LDL-CLCF1 proximity assay signal can be competed-out using excess of non-biotinylated CLCF1.** Biotinylated hCLCF1 was mixed with LDL, HDL and VLDL covalently coupled to acceptor beads (10 µg/mL) in presence of increased concentrations of unlabelled hCLCF1 (as indicated in the figure). Streptavidin donor beads (40 µg/mL) were further added for 1 h and 615 nM fluorescence signal assessed.

Figure 1

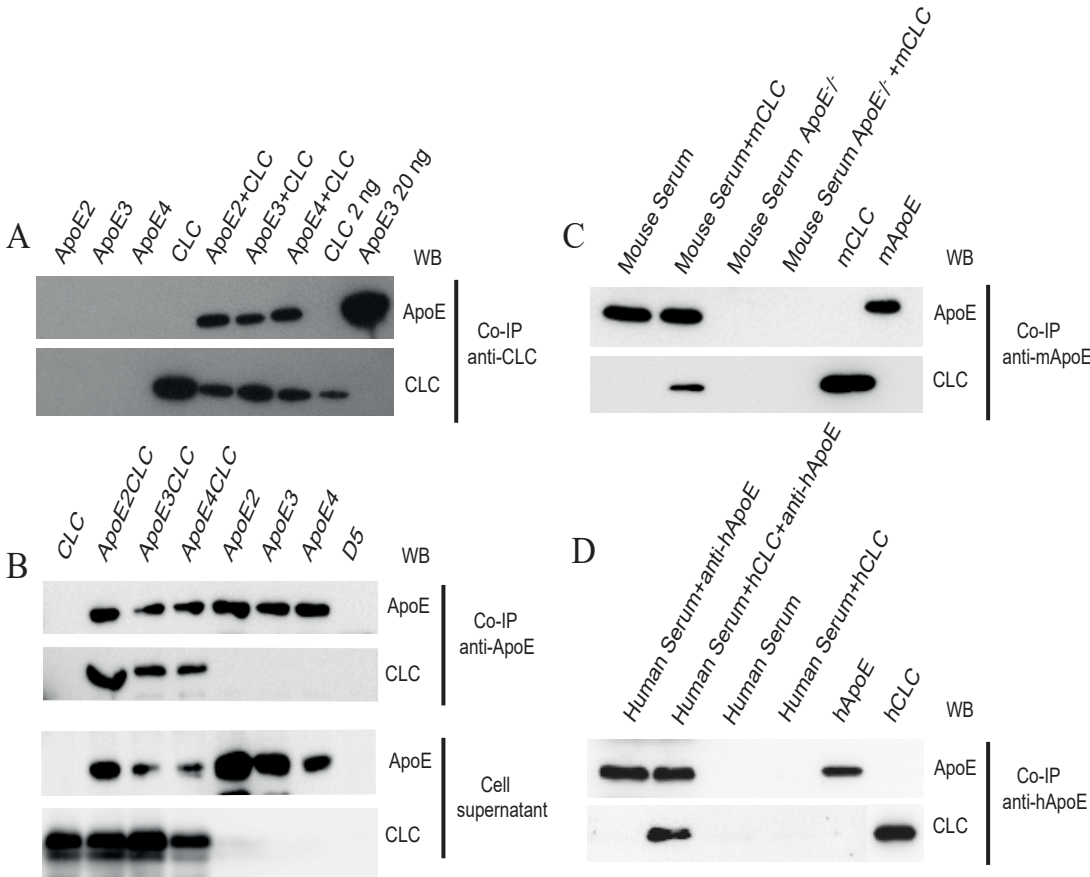


Figure 2

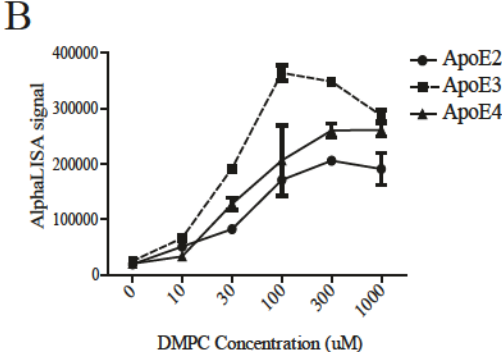
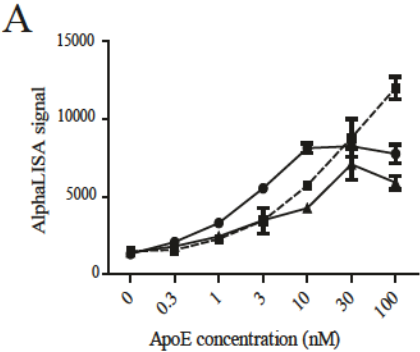
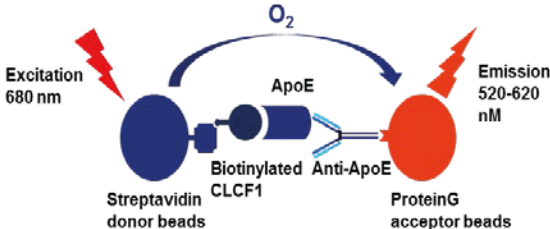


Figure 3

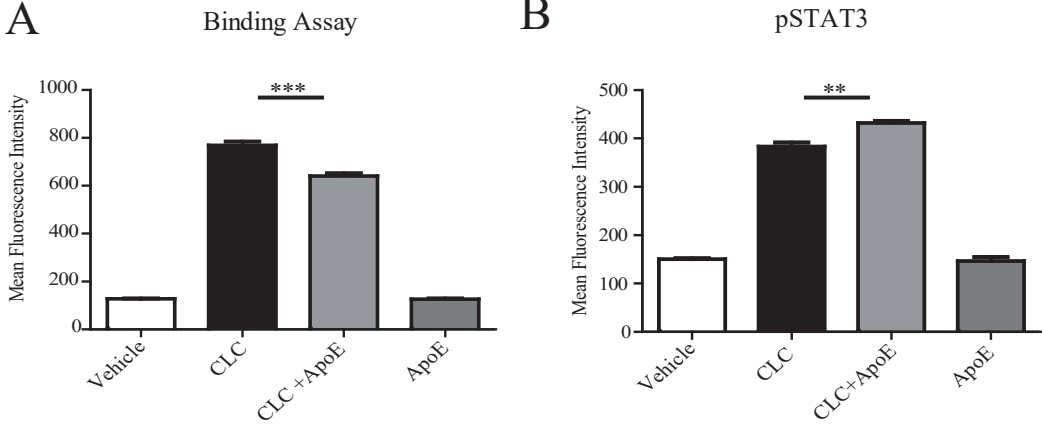


Figure 4

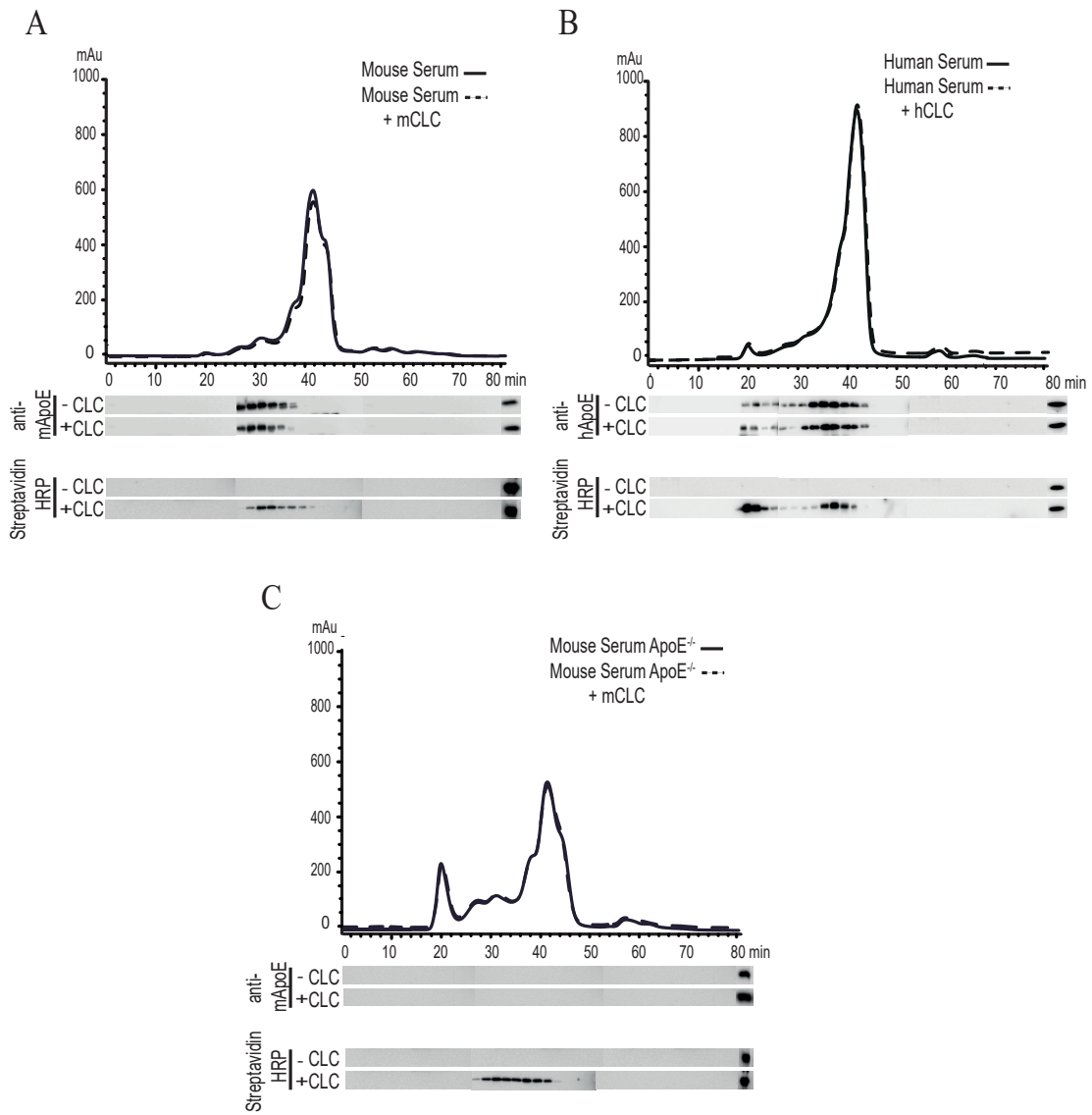




Figure 5

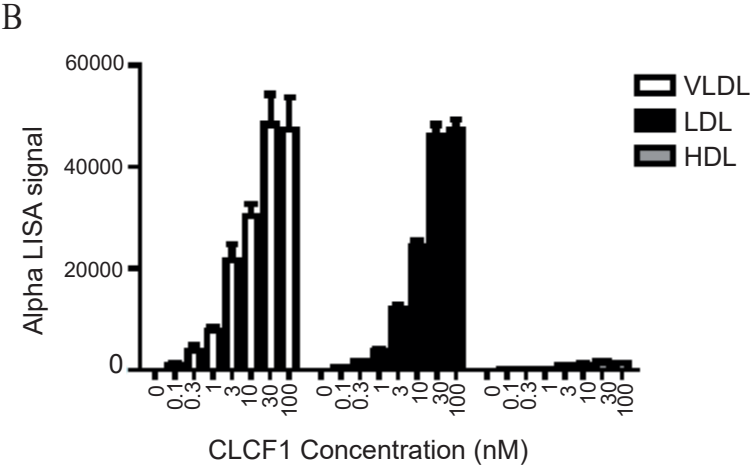
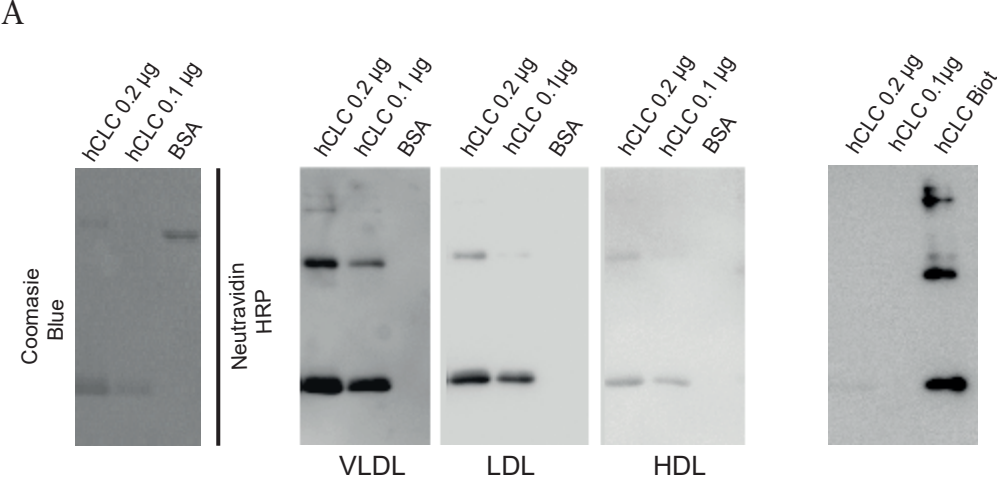


Figure 6

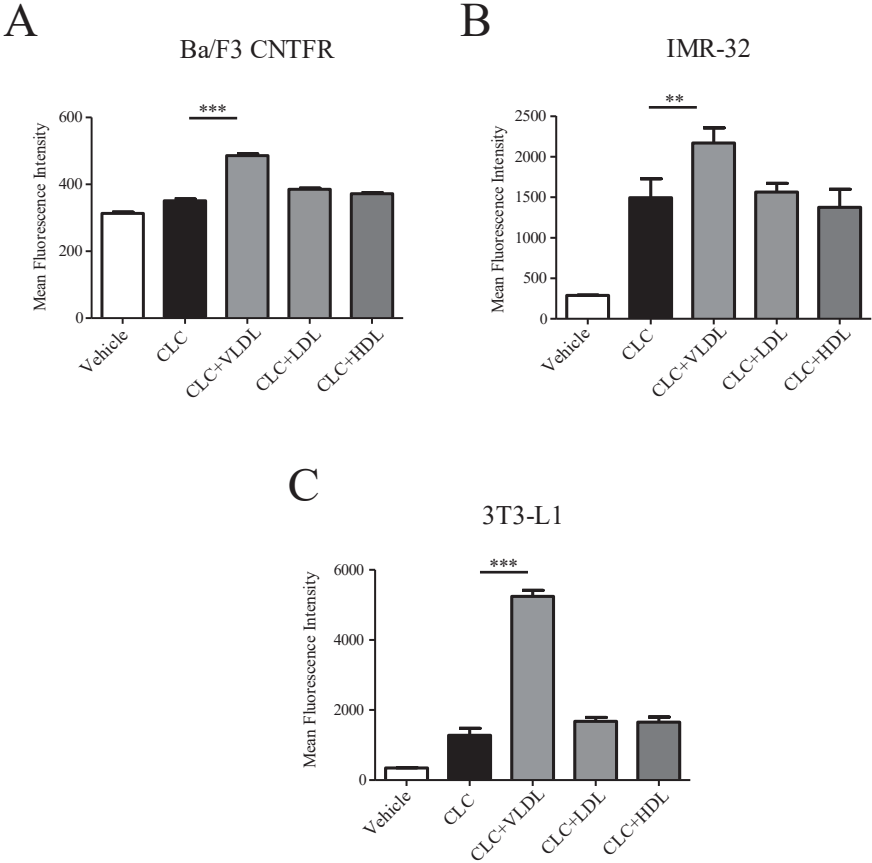


Figure 7

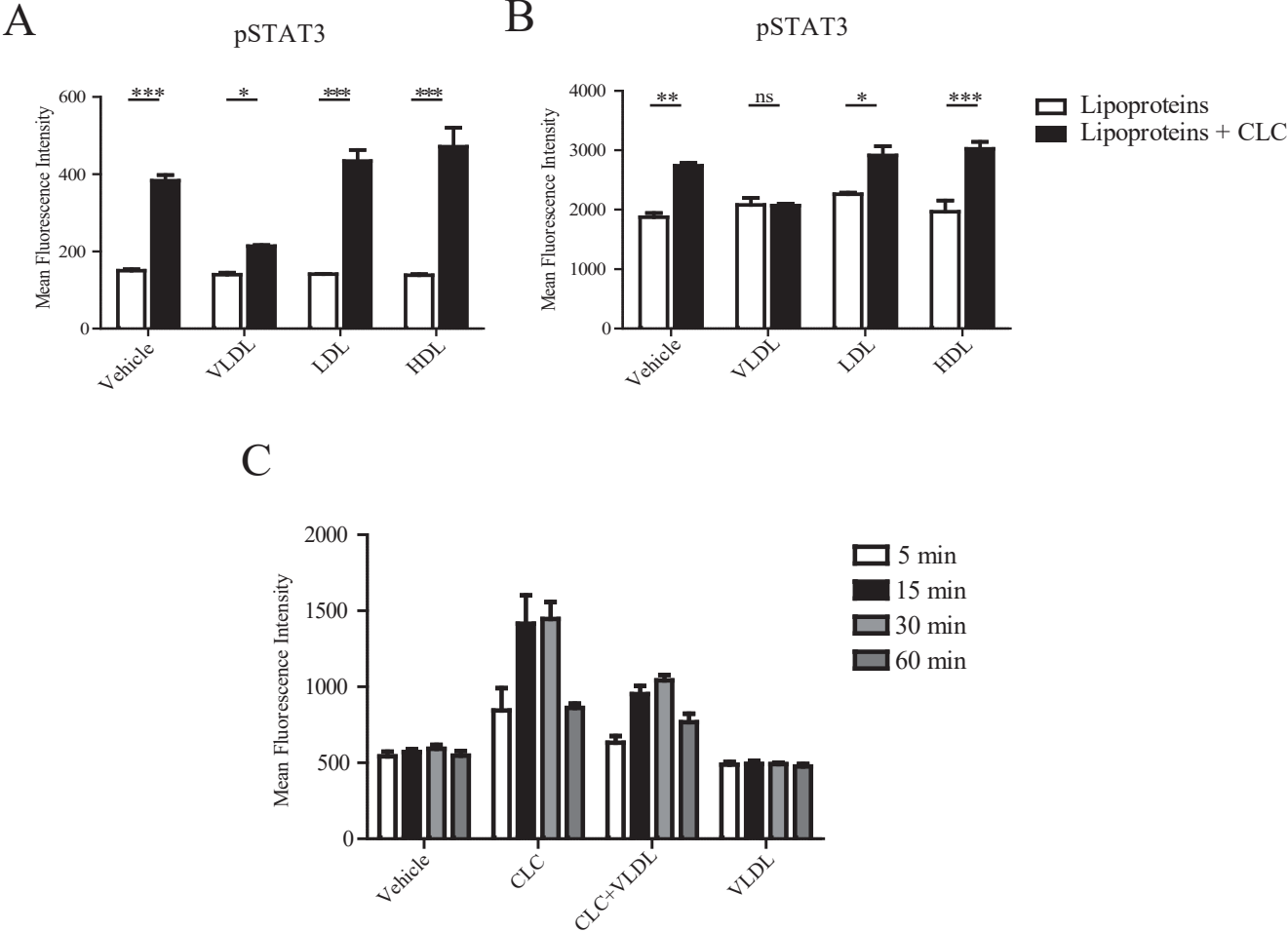


Figure 8

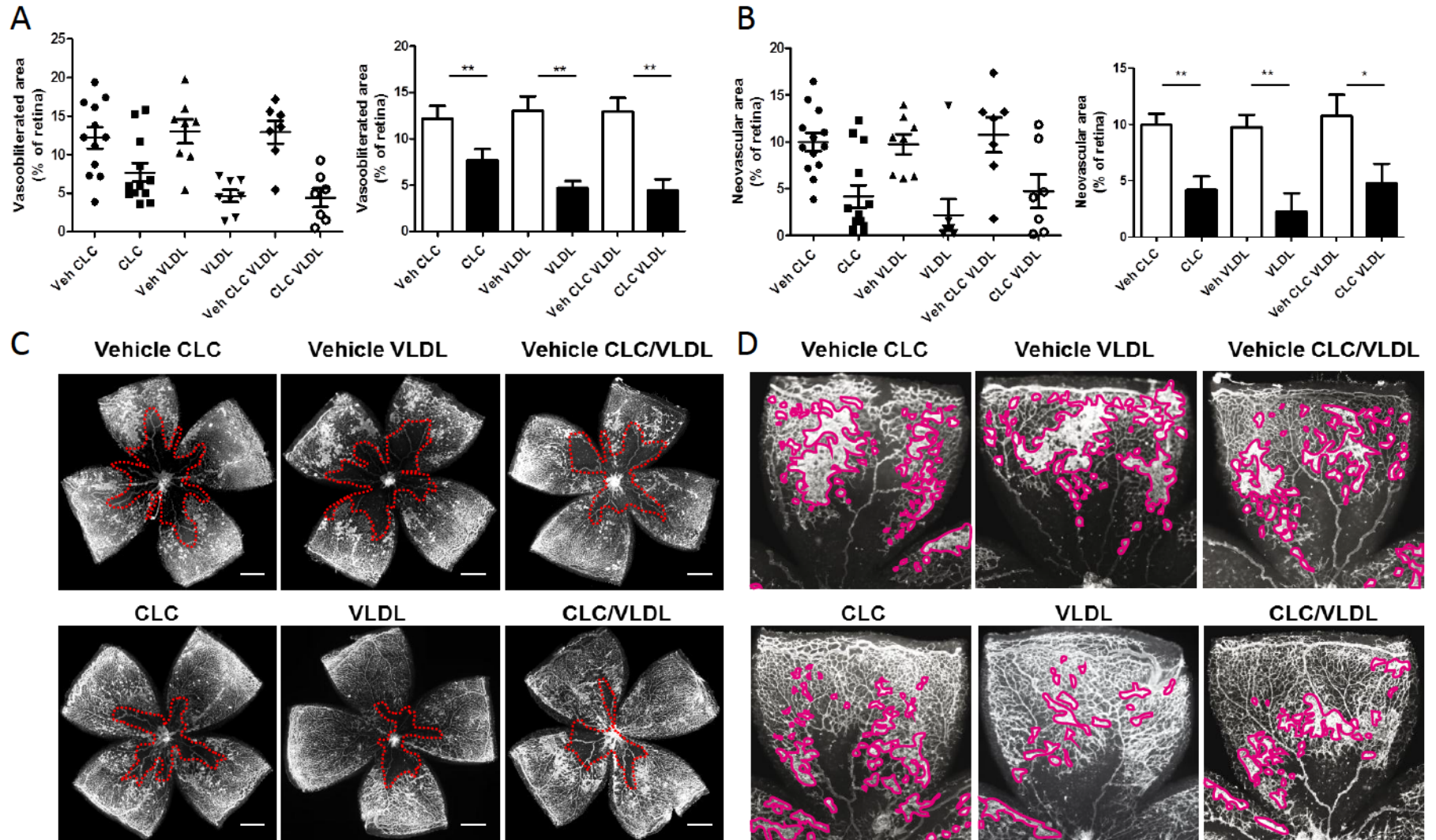
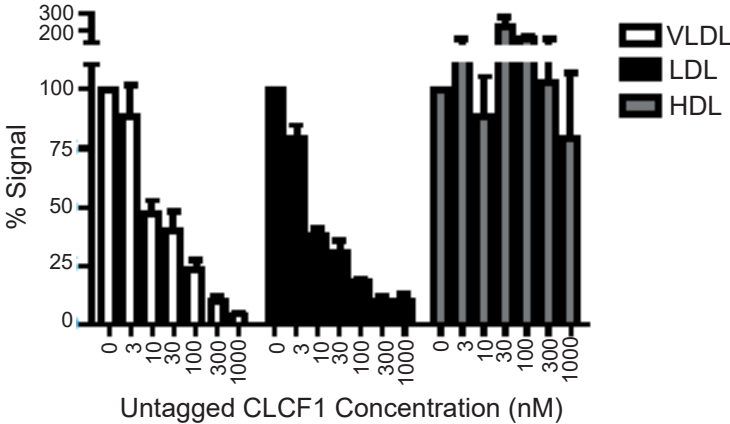


Figure S1



## Chapitre V : Discussion

Le réseau des cytokines de la famille IL-6/IL-12 est assez complexe dans lequel différentes cytokines peuvent partager des sous-unités, chaînes de récepteurs ou voies de signalisation tout en induisant des effets distincts (172). Au cours de cette étude nous avons en premier temps recherché à savoir si, à l'instar de ce qui avait été décrit pour le système IL-27 (EBI3/p28), IL-35 (EBI3/p35) et IL-39 (EBI3/p19), EBI3 pouvait former un autre complexe avec la cytokine monomérique IL-6 et induire des effets de type trans-signalisation en activant le récepteur membranaire gp130. Dans un second temps, nous avons caractérisé une nouvelle interaction entre la cytokine CLCF1 et la protéine apoE, impliquée principalement dans le transport des lipides. Nos travaux ont démontré que CLCF1 pouvait interagir avec les lipides et sont les seuls publiés à l'heure actuelle qui mettent en évidence la formation d'une "lipocytokine".

### I. Caractérisation du récepteur soluble EBI3

Le récepteur soluble EBI3 a été identifié par criblage de banque différentielle des lignées de lymphome de Burkitt infectée *in vitro* par l'EBV (109). La fonction de ce récepteur dépend de son interaction avec différentes sous-unités. EBI3 peut former des complexes non covalents avec les sous-unités p28, p35 et p19 pour former les cytokines composites IL-27, IL-35 et IL-39 respectivement (106, 174, 305).

#### ***EBI3, pourrait-il avoir des effets indépendants de l'IL-27 et l'IL-35?***

Plusieurs évidences suggèrent que la sous-unité p28 de l'IL-27 puisse être impliquée dans la formation d'autres complexes. Premièrement, les cinétiques d'expression des transcrits des deux sous-unités de l'IL-27 (p28 et EBI3) sont différentes. Par exemple, l'expression maximale de la sous-unité p28 est observée dans les cellules dendritiques humaines activées *in vitro* par le LPS après 3 à 6 heures, celle-ci devient indétectable après 24 heures de stimulation, tandis que l'expression maximale de l'EBI3 se produit tard et décroît plus lentement avec un niveau d'expression encore significatif à 72 heures (106). De plus, la sous-unité p28 pourrait être sécrétée seule dans la lignée cellulaire COS-7 et inhiber les effets antitumoraux de l'IL-27

en diminuant la phosphorylation en STAT1, la production des cellules TCD8<sup>+</sup> cytotoxiques ainsi que l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (306). En plus, il a été démontré que la sous-unité p28 interagit avec le récepteur soluble CLF et le complexe p28/CLF inhibe la différenciation des cellules Th17 (124). Finalement, la sous-unité p28 seule pourrait aussi induire une trans-signalisation par son interaction avec le récepteur soluble de l'IL-6 (307).

Des effets de l'EBI3 autres que son implication dans la formation de l'IL-27 et l'IL-35 ont été également observés. L'utilisation des cellules dendritiques est devenue un outil immunothérapeutique prometteur dans le rétablissement de la tolérance immunitaire en allogreffes et dans les pathologies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde. Des observations indiquent des effets reliés à l'EBI3 exprimé par les cellules dendritiques tolérogènes en allogreffes dans la tolérance immunitaire. Dans ce contexte, EBI3 induit l'expression d'INF- $\gamma$  par les cellules T doubles négatives (CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>), considérée essentielle pour contrôler la réponse immunitaire (308). Ce mécanisme ne semble pas faire partie des effets qui caractérisent les cytokines IL-27 et IL-35 sur les lymphocytes T étant donné que l'IL-27 induit l'expression d'INF- $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (309, 310) alors que l'IL-35 induit la production des lymphocytes T régulatrices qui sécrètent l'IL-10 et l'IL-35 (175).

Plusieurs travaux ont aussi démontré l'effet de l'EBI3 indépendant de l'IL-27 dans la progression tumorale. Tout d'abord, le dépistage génétique des cellules transformées par l'EBV *in vitro* a indiqué une forte expression d'EBI3 dans les tissus négatifs pour p28 et a été étroitement associé à l'élaboration de plusieurs tumeurs malignes lymphoïdes, y compris le lymphome endémique Burkitt (BL) et le lymphome de Hodgkin (HL) (109, 114). Comment ces tumeurs évitent la reconnaissance et la destruction par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques pour l'EBV a attiré beaucoup d'importance et suggère que l'EBI3 pourrait contrôler les réponses antivirales et antitumorales d'une manière indépendante de l'IL-27. Cet effet pourrait être possiblement dû à la formation de l'IL-35 bien que la fonction précise de l'IL-35 ne soit pas bien comprise dans le système immunitaire humain. Contrairement à l'IL-35 murin qui induit la prolifération des cellules T régulatrices et agit comme une cytokine immunosuppressive dans plusieurs modèles de maladies auto-immunes, des études ont démontré que les lymphocytes T régulateurs humains n'expriment pas l'IL-35 (112).

Une autre étude suggère un rôle pro-inflammatoire de l'EBI3 indépendant de l'IL-35 dans la défense de l'hôte contre le pathogène intracellulaire «*listeria monocytogenes*». Bien que les souris p35<sup>-/-</sup> ont échoué à contrôler la croissance bactérienne, les souris p35<sup>-/-</sup> EBI3<sup>-/-</sup> ont montré une augmentation de la sécrétion d'IL-17 par les cellules immunitaires innées et de l'immunité protectrice similaire aux souris EBI3<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent que cette bactérie utilise l'EBI3 pour échapper à la surveillance immunitaire chez les souris p35<sup>-/-</sup> par un mécanisme qui implique la différenciation Th17 (311). D'autre part, l'effet de l'EBI3 ne semble pas être lié à la formation de l'IL-27 en partant du fait que les souris IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> se caractérisent par une diminution de la production de l'IL-10 qui exerce plutôt des effets immunosuppresseurs (312). L'induction de la réponse inflammatoire implique donc un mécanisme autre que la formation de l'IL-27 ou l'IL-35.

Toutes ces observations, premièrement, la différence de la cinétique d'expression entre l'EBI3 et les deux sous-unités p28 et p35 de l'IL-27 et IL-35 respectivement, deuxièmement, la diversité des réponses que ça soit pro- ou anti-inflammatoires qui implique l'EBI3 en dehors des deux cytokines IL-27 et IL-35 suggère la présence d'un ou de plusieurs partenaires qui pourrait former un complexe avec l'EBI3. Un modèle homodimère de l'EBI3 a été également suggéré par plusieurs publications bien que ses activités biologiques n'a pas été encore étudiées.

Une étude récente a décrit une nouvelle cytokine, appelée IL-39, sécrétée par les cellules B actives et composée de l'EBI3 et de la sous-unité p19. Il a été observé dans cette même étude que l'IL-39 joue un rôle pro-inflammatoire dans le modèle de lupus érythémateux chez les souris (305). Ces observations indiquent à nouveau la possibilité de l'implication d'autres sous-unités autres que p28 et p35 dans les effets observés de l'EBI3.

### ***Comment mesurer l'activité biologique de la protéine recombinante EBI3?***

Toutes les publications visant à examiner les activités biologiques de l'EBI3 se basent sur l'utilisation des souris déficientes en EBI3. Ces études pourraient être non spécifiques et la déficience en EBI3 pourrait inhiber des effets de type IL-27, IL-35 ou IL-39. De plus, aucun essai n'a été utilisé actuellement pour tester l'activité de la protéine recombinante EBI3 *in vitro*. La renaturation de la protéine recombinante commerciale est évaluée seulement par un essai



qualitatif en liaison avec l'anticorps anti-EBI3. Dans notre étude, nous avons tout d'abord observé une prolifération de la lignée cellulaire B9 qui répond à l'IL-6 et qui exprime le récepteur IL-27R $\alpha$  en présence de l'EBI3. Nous avons interprété ces résultats par l'induction d'une réponse de type IL-27 par la formation du complexe entre l'EBI3 et la sous-unité p28 qui pourrait être produite d'une façon endogène. Étonnamment, EBI3 induit également la prolifération des cellules B9 qui répondent uniquement à l'IL-6. La prolifération des cellules B9 en présence de l'EBI3 n'implique donc pas l'IL-27. L'existence d'un autre partenaire de l'EBI3 autre que le p28 est donc probable.

Afin de tester l'implication de l'IL-35 sur les effets observés de l'EBI3, nous avons quantifié par RT-PCR l'expression de l'ARNm de la sous-unité p35. L'expression de p35 n'a pas été détectée, de plus, les cellules B9 ne prolifèrent pas en réponse à l'IL-35. Ces résultats suggèrent que l'effet de l'EBI3 sur la prolifération des cellules B9 n'est probablement pas associé à l'IL-35.

Il a été observé que les cellules B9 produisent de l'IL-6 endogène et elles prolifèrent en présence du sIL-6R $\alpha$  seul. Les séquences des acides aminés des deux récepteurs solubles, sIL-6R $\alpha$  et EBI3, sont homologues ce qui laisse croire que l'EBI3 pourrait former un complexe avec l'IL-6 endogène. Cela n'empêche pas que l'EBI3 pourrait également agir en formant un complexe homodimère ou avec une autre sous-unité qui pourrait être produite par ces mêmes cellules. Des observations ont montré que la sous-unité p40, homologue à l'EBI3, peut former un homodimère biologiquement actif qui inhibe les effets de l'IL-12 et qui pourrait aussi induire des effets pro-inflammatoires et être associé à différentes pathologies auto-immunes comme dans le modèle EAE de la sclérose en plaques.

### ***Identification d'une nouvelle interaction de l'EBI3***

En plus de la prolifération cellulaire, EBI3 induit la phosphorylation en STAT3 sur la lignée cellulaire B9 (figure 3 du premier papier) et l'activation de la voie STAT1 (figure 24) et STAT3 (figure 4 du premier papier) sur les cellules T CD4<sup>+</sup>. La réponse des cellules B9 en présence d'EBI3 suggère un rôle différent de l'IL-27 et l'IL-35 étant donné que ces cellules n'expriment pas la chaîne IL-27R $\alpha$  et ne prolifèrent pas en présence de la protéine recombinante

IL-35 (figure 23). En partant du fait que la lignée cellulaire B9 exprime l'IL-6 d'une façon endogène, et que les effets de l'EBI3 sur les cellules T ont été analysés par un marquage spécifique des cellules TCD4<sup>+</sup> à partir des splénocytes totaux qui pourraient sécréter l'IL-6 dans le milieu extracellulaire, nous avons examiné le rôle de l'IL-6 dans l'activation des cellules B9 et TCD4<sup>+</sup> en présence de l'EBI3.

La prolifération des cellules B9 et l'activation spécifique de la voie STAT3 sur les cellules B9 et TCD4<sup>+</sup> ont été inhibées en bloquant l'IL-6 ce qui suggère que l'EBI3, en formant un complexe avec l'IL-6, pourrait induire l'activation de la voie STAT3. Ces résultats corrélerent avec la voie de signalisation induite par le mécanisme de la trans-signalisation médié par le sIL-6R qui active spécifiquement la voie STAT3, mais pas STAT1. En corrélation avec ces résultats, l'activation des voies STAT1 et STAT3 en présence de l'EBI3 par les cellules T CD4<sup>+</sup> a été observée chez les souris IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> (figure 25 *A* et *B*). Cela confirme que les deux voies de signalisation induites par l'EBI3 n'impliquent pas la formation de l'IL-27. La voie STAT3 pourrait être induite par le complexe formé entre l'EBI3 et l'IL-6 comme nous l'avons démontré en bloquant l'IL-6.

En présence des faibles concentrations d'EBI3, nous avons observé une prolifération plus élevée des cellules B9 par rapport aux cellules B9/IL-27R $\alpha$ . Comme l'effet d'EBI3 a lieu en conjonction avec l'IL-6 qui pourrait être médié par le récepteur gp130, nous avons examiné l'expression de l'IL-6 endogène et du récepteur gp130 exprimé à la surface des cellules. Aucune différence n'a été observé concernant l'expression du récepteur gp130 (figure 24, *A*), par contre, les cellules B9 secrètent plus de l'IL-6 par rapport aux B9/IL-27R $\alpha$  (figure 24, *B*). Ces résultats étaient donc en accord nos suggestions.

En ce qui concerne la signalisation en STAT1, l'inhibition de l'IL-6 n'empêche pas l'activation de cette voie par les cellules TCD4<sup>+</sup> en réponse à l'EBI3 (figure 24). L'activation de la voie STAT1 par les cellules TCD4<sup>+</sup> ne semble donc pas être due au complexe EBI3/IL-6 ni à la formation de l'IL-27 étant donné que la voie STAT1 induite par l'EBI3 est maintenue chez les souris IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup>. Une réponse immunitaire en présence de l'EBI3 pourrait être due à des effets de type IL-35 en formant un complexe avec la sous-unité p35. Des publications ont

suggéré que la liaison de l'IL-35 sur l'IL-12R $\beta$ 2 induit la phosphorylation de la voie STAT1 tandis que l'interaction avec la sous-unité gp130 active la voie STAT4 (171). L'activation de la voie STAT1 par EBI3 pourrait être expliquée par l'effet du complexe EBI3/p35 (IL-35) sur le récepteur dimérique composé de deux chaînes d'IL-12R $\beta$ 2 quoique l'étude de l'activation de la voie STAT4 serait également nécessaire pour analyser l'implication du récepteur gp130.

En revanche, des études ont démontré que l'induction de l'expression du récepteur IL-12R $\beta$ 2 sur les cellules T CD4<sup>+</sup> implique l'IL-27 (313). En partant de ce fait, l'absence de la réponse de type IL-27 chez les souris IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> suggère une absence d'expression d'IL-12R $\beta$ 2 et laisse donc croire que l'activation de la voie STAT1 par l'EBI3 n'est pas associée à l'IL-35. Une étude de la réponse d'IL-35 sur les cellules TCD4<sup>+</sup> des souris IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup> pourrait être nécessaire pour mieux comprendre ces résultats.

Pour confirmer l'implication de l'IL-6 sur les effets observés de l'EBI3, on a produit la protéine fusion EBI3/IL-6 et on a observé que celle-ci induit la prolifération et l'activation de la voie STAT3 de la lignée cellulaire BA/F3 qui ne répond pas à l'IL-6 quoique cet effet reste faible comparativement à la protéine fusion hyper-IL-6. Cela pourrait être dû à une faible affinité envers le récepteur gp130 du complexe EBI3/IL-6 par rapport à l'hyper-IL-6. Nous avons également confirmé l'interaction entre EBI3 et IL-6 en utilisant des expériences de co-immunoprécipitation à partir de surnageant des cellules 293 transfectées par un vecteur bicistronique dans lequel la séquence d'ADN codant pour les deux sous-unités de EBI3/IL-6 contenait un peptide autoclivant T2A. L'EBI3 humain présente une ressemblance d'acides aminés d'environ 63% avec l'EBI3 murin (314). Nous avons démontré une interaction à la fois de l'EBI3 humain et murin avec l'IL-6. L'utilisation de la technique du SPR nous a permis de calculer l'affinité de ce complexe (3,4  $\mu$ M) considérée faible en comparaison avec l'affinité du complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  (1 nM). Pourtant, ceci ne devrait pas exclure les effets qui pourraient être induits par le complexe EBI3-IL-6 principalement dans les tissus qui se caractérisent par une forte expression locale d'IL-6 en cas d'inflammation. La concentration sérique d'EBI3 est aussi considérée importante chez les femmes enceintes; celle-ci augmente de 2 ng/ml et atteint 446 ng/ml à la fin de la phase gestationnelle (113).

### ***Les activités biologiques observées de l'EBI3***

Lors de l'étude de l'activité biologique de l'EBI3, nous avons constaté plusieurs effets de ce récepteur soluble sur les lymphocytes T. Nous avons étudié l'effet de l'EBI3 sur la différenciation des cellules TCD4<sup>+</sup> stimulées en présence d'anti-CD3 et anti-CD28 dans des conditions qui favorisent la différenciation en Th17 (figure 26). Nous avons observé que l'EBI3 induit la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en cellules Th1. L'hypothèse la plus simple qui pourrait expliquer cet effet est la formation du complexe IL-27 (EBI3/p28) , par ailleurs, des études ont montré que l'induction de la différenciation Th1 en présence de l'IL-27 est médiée par la voie STAT1 (315). Nos observations ont indiqué l'activation de cette voie même en absence d'une réponse de type IL-27 chez les souris IL-27R $\alpha^{-/-}$  ce qui suggère que cet effet pourrait également être induit par un autre mécanisme qui n'implique pas l'IL-27 ni l'IL-35 étant donné que l'IL-35 n'a pas d'effet sur la polarisation Th1. D'autre part, on a examiné l'effet de l'EBI3 sur la production du GM-CSF. Le GM-CSF est une cytokine ancéplalithogénique produite essentiellement par les cellules Th17 complètement différenciées. Comme l'IL-27, nous avons observé que l'EBI3 diminue la production du GM-CSF. Cet effet corrèle avec le rôle anti-inflammatoire de l'IL-27 dans l'inhibition de la différenciation des cellules Th17 et la production du GM-CSF (figure 27).

La différenciation des cellules Th1 et la production du GM-CSF pourraient aussi être dues à la formation du complexe entre l'EBI3 et l'IL-6 endogène sécrétée par les cellules TCD4<sup>+</sup> stimulées en présence d'anti-CD3 et anti-CD28. En effet, l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> induit également le clivage protéolytique de la chaîne IL-6R $\alpha$  ancré à la membrane. Les cellules T CD4<sup>+</sup> répondent donc à la fois à la signalisation classique et à la trans-signalisation de l'IL-6. Pour cette raison, l'étude de l'effet du complexe EBI3/IL-6 sur les cellules T CD4<sup>+</sup> devrait prendre en considération les effets non spécifiques qui peuvent être induits par l'IL-6 endogène.

Premièrement, il serait utile de voir si l'effet de l'EBI3 sur la différenciation des cellules Th1 et l'inhibition de la production du GMCSF est reproduit chez les souris IL-27R $\alpha^{-/-}$ . Deuxièmement, l'inhibition de l'IL-6 en utilisant un anticorps anti-IL-6 ou de la trans-signalisation par la chaîne sgp130 pourrait également investiguer l'implication de la trans-

signalisation de l'IL-6 médié par l'EBI3 sur les réponses observées. Dans ce contexte, l'inhibition de la signalisation de l'IL-6 pourrait aboutir à des résultats spécifiques à l'EBI3 étant donné que le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  n'a pas d'effet sur la différenciation des cellules Th1, de plus, il a été démontré que l'IL-6 induit plutôt une augmentation de la production du GM-CSF (316). Dans certains contextes, l'utilisation des anticorps spécifiques pour inhiber les effets de l'IL-6 semble ne pas être aussi efficace et peut uniquement agir sur la signalisation endogène de l'IL-6. Dans ce cas de figure, plusieurs stratégies pourraient être utiles comme l'utilisation d'un anticorps anti-IL-6R ou des souris IL-6R $\alpha$ <sup>-/-</sup>. L'absence de la chaîne IL-6R $\alpha$  pourrait enlever toute ambiguïté liée à l'activation de la voie de signalisation d'IL-6 endogène.

La difficulté de la compréhension des activités biologiques de l'EBI3 sur les cellules T CD4<sup>+</sup> nous a permis de réfléchir à d'autres types cellulaires qui n'expriment pas l'IL-6R et qui répondent spécifiquement à la trans-signalisation de l'IL-6 en présence du complexe IL-6/sIL-6R. Plusieurs cellules pourraient servir pour étudier les effets du complexe EBI3-IL-6. Par exemple, il a été observé que l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> *in vitro* par anti-CD28/anti-CD3 uniquement en présence du complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  induit l'expression de granzyme B (317). Des études ont démontré que les cellules T CD8<sup>+</sup> expriment la chaîne IL-6R $\alpha$  membranaire, mais contrairement aux cellules T CD4<sup>+</sup>, elles ne produisent pas les métalloprotéases impliquées dans le clivage du récepteur (68). D'autre part, le liquide synovial des patients atteints de l'arthrite rhumatoïde se caractérise par une forte concentration de sIL-6R $\alpha$ . Il a été démontré que l'activation des cellules synoviales *in vitro* en présence du complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  induit la sécrétion de la chimiokine MCP-1 qui pourrait être impliquée dans l'infiltration des leucocytes au cours de la progression de cette pathologie (318). Enfin, les cellules endothéliales sont aussi considérées un bon système d'étude de l'inflammation locale *in vitro* en réponse à la trans-signalisation. En utilisant des cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical (HUVEC), nous avons été capables de mieux caractériser l'effet du complexe EBI3/IL-6. Seul le complexe EBI3/IL-6 induit l'expression des chimiokines MCP-1 et MCP-3 par les cellules endothéliales ce qui suggère que l'EBI3 pourrait agir en recrutant les monocytes aux sites d'inflammation. Nous avons confirmé l'implication de la chaîne gp130 exprimée par les cellules endothéliales sur les effets observés de l'EBI3.

### ***Prédiction des sites d'interactions entre EBI3 et IL-6***

Les sites d'interactions constituent les points d'ancrage entre les cytokines et leur récepteur. Trois sites de liaisons ont été définis: site I, II et III. Les différents sites d'interactions entre les cytokines de la famille IL-6 et IL-12 permettent d'établir un modèle d'interaction du complexe EBI3/IL-6. Dans ce modèle, EBI3 pourrait lier l'IL-6 à travers le site I laissant les sites II et III pour la liaison avec gp130. La structure de l'IL-6R $\alpha$  contient 3 domaines, un domaine 1 de type Ig et 2 domaines (D2 et D3) de type FNIII. La liaison de l'IL-6 avec le sIL-6R $\alpha$  a lieu à travers les domaines D2 et D3 de FNIII. EBI3 ne possède pas un domaine Ig et contient uniquement 2 domaines qui sont les domaines de FNIII qui peuvent être nécessaires pour l'interaction avec l'IL-6.

Dans nos expériences, on a utilisé l'anticorps monoclonal 25F10 pour bloquer la trans-signalisation médiée par l'EBI3. En effet, le 25F10 se lie sur le domaine D3 de FNIII de l'IL-6R $\alpha$  impliqué également dans l'interaction avec le récepteur gp130. Le 25F10 peut lier à la fois l'IL-6R $\alpha$  soluble ou ancré à la membrane. L'inhibition spécifique de la voie de trans-signalisation de l'IL-6 est expliquée par son effet sur le changement de la conformation hexamérique de l'IL-6 obligatoire pour induire la trans-signalisation (51). Un modèle alternatif tétramérique (IL-6<sub>1</sub>-IL-6R<sub>1</sub>-gp130<sub>2</sub>) qui pourrait induire la voie de signalisation classique a été suggéré. Nos expériences montrent l'effet inhibiteur de l'anticorps monoclonal 25F10 sur l'effet de l'EBI3 sur les cellules B9. Une analyse d'homologie structurale entre le domaine D3 (FNIII) de l'IL-6R $\alpha$  et les domaines de FNIII de l'EBI3 suggère que le 25F10 se lie à un épitope situé à côté d'une phénylalanine-262 conservée entre l'EBI3 et l'IL-6R $\alpha$ .

### ***Les stratégies thérapeutiques dépendantes de l'EBI3***

Dans certaines pathologies, l'injection de l'EBI3 pourrait induire des effets anti-inflammatoires qui pourraient être dus à l'IL-27 et IL-35 en formant un complexe avec les sous-unités p28 et p35 libres. Plusieurs études ont montré l'effet bénéfique de l'injection de l'EBI3 comme dans le traitement de la sclérose systémique induite par la bléomycine (319). En revanche, ces stratégies devraient prendre en considération les effets pro-inflammatoires de

l'EBI3 observés dans notre étude en relation avec l'IL-6. La combinaison du traitement avec des molécules inhibitrices de la trans-signalisation comme sgp130 serait fortement suggérée.

Les effets observés du complexe EBI3/IL-6 restent faibles relativement à la trans-signalisation de l'IL-6 ce qui pourrait être causé par une faible affinité envers le récepteur gp130. Si cela est vrai, l'inhibition de la trans-signalisation de l'IL-6 médié par l'EBI3 pourrait nécessiter des concentrations plus faibles du sgp130 ce qui pourrait éviter les effets secondaires reliés à l'utilisation de cette molécule en thérapie. Il a été démontré qu'une grande concentration du sgp130 inhibe également les effets bénéfiques de la signalisation classique de l'IL-6 (320). L'affinité du complexe IL-6/sIL-6R a été étudiée, celle-ci est équivalente à 10 pM (321). Nous avons été capable d'observer une interaction entre la protéine EBI3/IL-6 en fusion, mais d'autres études seront nécessaire pour déterminer l'affinité de ce complexe envers le récepteur gp130.

D'autre part, le complexe EBI3/IL-6 pourrait influencer l'efficacité du traitement qui cible la trans-signalisation de l'IL-6 médié par le sIL-6R $\alpha$ . Par exemple, certains inhibiteurs de la trans-signalisation de l'IL-6 comme le sgp130 pourraient aussi inhiber les effets du complexe EBI3/IL-6. En revanche, d'autres inhibiteurs qui ciblent spécifiquement le sIL-6R ou le complexe IL-6/sIL-6R pourraient ne pas avoir un effet sur la signalisation induite par EBI3/IL-6. Ainsi, les effets pro-inflammatoires du complexe EBI3/IL-6 pourraient être produits même en bloquant la trans-signalisation de l'IL-6. Des études supplémentaires devraient avoir lieu afin d'étudier la similarité des propriétés pro-inflammatoires des deux composés. Certains traitements ciblant la trans-signalisation de l'IL-6 ne sont pas efficaces et cela pourrait être dû à la voie alternative inflammatoire dépendante de l'EBI3.

En conclusion, nos résultats sont les premiers à montrer des effets qui impliquent une chaîne différente de l'IL-6R dans la réponse de l'IL-6. Dans ce travail, nous avons également montré l'existence d'autres partenaires différents de la famille des cytokines. Dans la deuxième partie de cette thèse, nos études ont clairement démontré une interaction entre la cytokine CLCF1 et les différentes isoformes d'apoE. Ces données suggèrent une nouvelle fonction pour l'apoE dans le système nerveux qui pourrait agir comme une protéine accessoire pour le CLCF1 et potentialiser ses effets.

## II. Nouvelles Caractéristiques de la cytokine CLCF1

CLCF1 est une cytokine qui induit le signal à travers le récepteur gp130/LIF-R $\beta$ /CNTFR $\alpha$  (183). Le rôle du CLCF1 dans le système immunitaire est médié par une chaîne de récepteur autre que la chaîne CNTFR $\alpha$  étant donné que celle-ci n'est pas exprimée par les cellules immunitaires. L'identification de nouveaux partenaires au CLCF1 semble donc nécessaire pour bien comprendre le mécanisme d'action de cette cytokine.

### *CLCF1 constitue une nouvelle "lipocytokine"*

En présence des lipides, l'apoE subit un changement de conformation causé par une réorganisation des hélices  $\alpha$  qui facilite l'exposition des régions hydrophobes de l'apoE envers les particules lipidiques (322). Nos résultats ont démontré la formation du complexe apoE/CLCF1 dans le sérum ce qui suggère que la forme apoE associée aux lipides ne bloque pas l'interaction avec CLCF1. Nos essais ont été élaborés sur à la fois le sérum humain et souris. Il serait donc important d'examiner l'interaction du CLCF1 en présence de différentes isoformes individuellement, ceci pourrait être étudié en utilisant des souris apoE<sup>-/-</sup> transgéniques qui expriment différentes isoformes humaines à la place de l'apoE endogène de la souris.

L'apoE est situé principalement au niveau des résidus de chylomicrons, VLDL et une sous-classe des HDL (323), la liaison du CLCF1 avec la forme associée aux lipides de l'apoE suggère que CLCF1 pourrait aussi se lier à ces particules à travers l'apoE. Nous avons donc utilisé la technique de la chromatographie en phase liquide (FPLC) afin de purifier les différentes fractions lipidiques contenant dans le sérum souris et humain en présence ou non du CLCF1. Les résultats obtenus ont montré une coélution de l'apoE avec CLCF1 dans les fractions LDL et une partie des HDL possiblement les résidus HDL1 dans le sérum souris et au niveau des fractions VLDL, LDL et HDL dans le sérum humain. La présence de l'apoE dans les fractions LDL ne corrèle pas avec les données de littérature, il serait donc intéressant d'examiner la possibilité d'une contamination avec VLDL ou une partie de HDL dans la fraction éluée. Plusieurs techniques pourraient servir à déterminer la nature de la fraction éluée. Les LDL contiennent de l'apoB à la surface tandis que les HDL se caractérisent par la présence d'apoA,



la technique d'immunobuvardage de type «western blot» avec un anti-apoB ou anti-apoA pourrait donc détecter la présence des deux apolipoprotéines. La spectroscopie de masse pourrait également être utile pour identifier les différentes molécules contenues dans la fraction. À ce moment il est possible de voir que l'apoE est associé avec les résidus HDL1 ou VLDL et non pas les LDL. En conjonction avec ces résultats, nous avons observé une co-élution du CLCF1 avec les fractions VLDL et LDL ajoutées séparément par chromatographie de filtration sur gel (figure 28).

En utilisant le sérum des souris apoE<sup>-/-</sup>, nous avons remarqué que CLCF1 est élué dans les fractions LDL et les résidus HDL1, tout comme le sérum des souris contrôles. Ces résultats nous ont paru surprenants dans un premier temps. Plusieurs éléments peuvent expliquer l'élution du CLCF1 en absence d'apoE. Une évaluation de la présence de l'apoB ou de l'apoA dans les fractions lipidiques éluées serait nécessaire et pourrait suggérer des interactions du CLCF1 avec des lipoprotéines autres que l'apoE. Ces résultats pourraient être confirmés par la suite en utilisant des souris apoB<sup>-/-</sup> ou apoA<sup>-/-</sup>. D'autre part, une autre explication à prendre en compte est la possibilité d'une interaction directe du CLCF1 avec les lipides. La surface des lipoprotéines contient du cholestérol et des phospholipides, et l'interaction du CLCF1 avec ces deux composés devrait être testée. Une technique repose sur l'utilisation d'une membrane hydrophobe recouverte des lipides membranaires et incubée en présence du CLCF1 permettrait une détection du signal en présence d'un anticorps HRP spécifique pour CLCF1. La technique de la SPR en utilisant des surfaces adaptées pour l'immobilisation du cholestérol est aussi envisageable.

### ***Le complexe apoE/CLCF1 pourrait-il avoir un impact sur les effets de ces deux protéines envers leur récepteurs ?***

L'association des lipides avec l'apoE augmente son affinité envers les récepteurs des LDL, à savoir, LDLR, apoE2, VLDLR, et LRP1 (259). Il serait intéressant d'étudier si l'interaction du CLCF1 avec l'apoE pourrait varier en fonction des lipides et regarder si cette interaction pourrait aussi influencer l'affinité de l'apoE envers les récepteurs des LDL.

En plus des récepteurs des LDL, apoE pourrait également induire un signal à travers SORL1, un récepteur relié structurellement à la sortiline exprimée à la fois au niveau du CNS et en périphérie. Il a été observé que la clairance de l'amyloïde- $\beta$  à travers la barrière hématoencéphalique en présence de l'apoE pourrait être médié à travers la sortiline (324). La sortiline est une protéine d'environ 100 kDa qui possède un seul domaine transmembranaire incapable de transmettre seul un signal intracellulaire. La recherche de ses activités à la surface cellulaire permet l'identification de plusieurs partenaires comme le CLCF1 et CNTF. En effet, il a été démontré que la sortiline améliore le signal du CNTF et CLCF1 qui engagent le complexe gp130/LIFR $\beta$  (192). L'étude de l'activité du complexe apoE/CLCF1 sur les cellules exprimant la sortiline ou SORL1 est fortement suggéré.

D'autre part, Le complexe CLC/CLF n'empêche pas la liaison du CLC avec l'apoE comme nous l'avons démontré par co-immunoprécipitation. Une publication récente indique que le CLF seul pourrait également lier SORL1 et induire le renouvellement du signal et une augmentation de l'activité du CLC en présence du sCNTFR. En revanche, l'activation du SORL1 par CLF semble atténuer le signal du CLC sur les cellules qui expriment le récepteur membranaire du CNTF. Seul apoE et CLF pourrait lier SORL1, l'effet du SORL1 sur les études des effets biologiques du CLC/CLF en présence d'apoE devrait prendre en considération les fonctions biologiques distinctes du CLF/SORL1 sur le sCNTFR et la forme membranaire du CNTFR (325).

### ***L'administration du complexe apoE/CLCF1 constituerait-il une nouvelle approche thérapeutique?***

L'apoE4 constitue un facteur de risque majeur dans la maladie d'Alzheimer par différents mécanismes. Premièrement, l'apoE4 induit une réaction pro-inflammation au niveau du système nerveux central qui se caractérise par une sécrétion des cytokines qui induisent l'activation des microglies. Deuxièmement, l'interaction de l'amyloïde- $\beta$  avec l'apoE est beaucoup plus faible en présence de l'allèle E4 ce qui diminue sa clairance (288). L'effet neuroprotecteur du CLCF1 et nos études qui ont démontré une interaction entre CLCF1 et apoE4 suggèrent que l'injection du CLCF1 pourrait donc induire des effets thérapeutiques bénéfiques

sur la maladie d'Alzheimer à travers l'apoE. Dans ce contexte, CLCF1 pourrait augmenter la clairance de l'amyloïde- $\beta$  associée à l'apoE à travers la chaîne CNTFR $\alpha$  exprimée par la barrière hématoencéphalique, en outre, l'affinité du complexe apoE4/amyloïde- $\beta$  pourrait être modifiée en présence du CLCF1. La sortiline, exprimée aussi à la surface de la barrière hématoencéphalique, pourrait favoriser la clairance de l'amyloïde- $\beta$  en présence du CLCF1. Mis à part l'interaction du CLCF1 avec l'apoE, des études supplémentaires devront avoir lieu pour évaluer l'interaction directe du CLCF1 avec l'amyloïde- $\beta$ .

Contrairement à l'apoE, CLCF1 constitue l'un de facteurs de perméabilité circulant qui contribue à la progression de la maladie du FSGS (204). L'apoE est présent dans l'urine et le sérum des patients tandis qu'il est absent dans le glomérule. Les souris déficientes en apoE présentent une augmentation de la prolifération et la production de la matrice extracellulaire qui aboutit à la progression de la maladie (291). L'un des mécanismes qui pourraient expliquer le rôle bénéfique de l'apoE dans cette pathologie est la formation du complexe apoE/CLCF1 qui pourrait atténuer les effets du CLCF1 et diminuer l'exacerbation de la maladie. Un autre mécanisme s'ajoute, l'une des approches thérapeutiques utilisées pour le traitement des patients atteints du FSGS est l'aphérèse des lipides. L'interaction du CLCF1 avec les lipides pourrait éliminer le CLCF1 de la circulation.

CLCF1 induit des effets sur les cellules immunitaires qui n'expriment pas la chaîne CNTFR $\alpha$  et dont on ignore encore le récepteur. Plusieurs observations montrent l'implication d'apoE dans la modulation de la réponse immunitaire par plusieurs mécanismes comme son rôle dans l'inhibition de la différenciation des cellules Th1 et l'induction la polarisation des macrophages anti-inflammatoires M2 (269). L'expression des récepteurs d'apoE a la surface des cellules immunitaires pourrait constituer l'un des mécanismes qui contribuent aux effets immunitaires observés du CLCF1. Toutefois, cela n'empêche pas que le CLCF1 pourrait induire des effets immunitaires en absence d'apoE et la nécessité de trouver le ou les récepteurs qui contribuent aux effets directs du CLCF1 sur ces cellules est indispensable.

## ***Transport des lipides complexés avec CLCF1 aurait-il un impact sur les effets thérapeutiques du CLCF1?***

Les approches thérapeutiques basées sur l'injection systémique de la cytokine entraînent souvent des effets secondaires néfastes qui limitent leur utilité. Comme beaucoup d'autres protéines thérapeutiques, les cytokines administrées par voie intraveineuse sont rendues inefficaces par la dégradation des protéines ou l'induction d'une liaison aux récepteurs non spécifiques. Une approche consiste à utiliser des capsules lipidiques qui permettent le transport des cytokines vers les cellules ou tissus spécifiques, sans pour autant subir une dégradation (326). Nos observations ont démontré l'interaction naturelle des lipides avec la cytokine CLCF1. En partant de ce fait, cette cytokine pourrait inciter des effets thérapeutiques ciblés, dont les effets secondaires rencontrés avec les injections systémiques des autres cytokines utilisées actuellement en essais cliniques sont imperceptibles.

L'interaction avec les lipoprotéines principalement, VLDL et LDL, pourrait modifier les effets du CLCF1 à travers la chaîne CNTFR $\alpha$ . Dans ce contexte, nous avons observé que l'injection intraoculaire du VLDL diminue les effets thérapeutiques du CLCF1 chez les souris atteintes d'une rétinopathie *in vivo*. Un tel effet pourrait se reproduire sur d'autres cellules comme les adipocytes. Il a été observé que l'injection du CNTF aux souris ob/ob induit une perte du poids et augmente la sensibilité à l'insuline à travers la chaîne CNTFR $\alpha$  exprimée par les adipocytes (327). L'effet du CLCF1 sur la formation du tissu adipeux en conjonction avec les lipides devrait être étudié. Par ailleurs, CLCF1 pourrait constituer une voie alternative de la clairance des lipides à travers la chaîne CNTFR $\alpha$  exprimée par différentes cellules impliquées le processus de la clairance des lipides comme les hépatocytes, les cellules B et les macrophages. Ceci dit que CLCF1 pourrait jouer un rôle thérapeutique bénéfique dans la maladie de l'athérosclérose.

## Chapitre VI : Conclusion

L'analyse et l'interprétation des données présentées dans cette thèse nous ont permis de constater la présence de nouvelles interactions des cytokines.

Le premier papier suggère un nouveau modèle de trans-signalisation de l'IL-6 médié par l'EBI3. Dans ce modèle, le récepteur soluble EBI3 pourrait substituer la chaîne  $\alpha$  soluble de l'IL-6R et induire le signal à travers le récepteur membranaire gp130. Ce mécanisme aurait probablement un impact sur les différentes réponses observées de l'EBI3 qui ont lieu en dehors des cytokines IL-27 et IL-35. Nous avons démontré des effets similaires à la trans-signalisation de l'IL-6 sur les cellules endothéliales humaines, cependant, d'autres expériences seront nécessaires pour mieux comprendre l'effet du complexe EBI3/IL-6 sur les différents mécanismes pathologiques qui impliquent l'IL-6. La compréhension globale de différentes voies de signalisation de l'IL-6 aurait un impact sur les stratégies thérapeutiques qui impliquent l'utilisation des molécules inhibitrices de la trans-signalisation.

Le deuxième papier de cette thèse a pu démontrer un nouveau mécanisme qui implique l'effet de la cytokine CLCF1 à travers son interaction avec les différentes isoformes d'apolipoprotéine E. Par ailleurs, nous avons aussi observé que CLCF1 interagit avec les différentes fractions lipidiques à savoir les VLDL, LDL, et HDL et cela même en absence d'apoE. L'interaction avec l'apoE et les différentes lipoprotéines pourraient attribuer au CLCF1 de nouvelles fonctions biologiques.

En somme, les deux publications nous permettent d'élargir nos connaissances sur le nombre des interactions qui peuvent avoir lieu entre les différentes cytokines et leurs récepteurs solubles ou d'autres partenaires comme les apolipoprotéines. Nos études suggèrent une bonne compréhension de différents mécanismes et interactions possibles des cytokines qui peuvent induire des effets différents avant toute utilisation en thérapie.

## Chapitre VII : Résultats supplémentaires

### Matériels et méthodes

**Essais de prolifération**— Les cellules B9 ont été incubées pendant 72h à 37°C en triplicata en présence des concentrations indiquées des protéines recombinantes IL-6 et IL-35. La prolifération a été mesurée par fluorimétrie (AlamarBlue®, AbDSerotec, Cedarlane).

**Analyse de l'expression de l'IL-6 par les cellules B9 et B9/IL-27R**— L'expression de l'IL-6 a été analysée par RT-PCR en temps réel. Brièvement, l'ARN a été extrait par "EZ-10 Column Total RNA Mini-Prep Kits" (Bio Basic Inc, Markham, ON). L'intégrité de l'ARN a été évaluée en utilisant un "Bioanalyseur Agilent" à la plateforme génomique de l'institut de la recherche en immunologie et oncologie (IRIC, Montréal, QC). Des aliquotes de 0,5 µg d'ARN total ont été utilisées pour la synthèse du cDNA complémentaire par la transcriptase inverse Mu-MLV (ThermoFisher Scientific) en présence d'amorces aléatoires. L'expression de l'IL-6 a été évaluée à la plateforme génomique de l'IRIC par PCR en temps réel.

**Mesure de l'activation de la voie STAT1/3 par cytométrie en flux**— Les lymphocytes primaires ( $10^6$  cellules) de souris C57/BL6 ont été incubés pendant 15 min ou 16 h à 37°C avec ou sans l'anticorps monoclonal anti-IL-6 et en présence des concentrations indiquées des protéines recombinantes: EBI3, IL-27, et IL-6. Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CD4-APC, anti-pSTAT1-FITC, ou anti-pSTAT3-FITC, et ont été analysées sur un FACSCalibur cytomètre de flux (BD Biosciences). Les données ont été analysées par FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, OR).

**Différenciation des cellules Th1 et Th17**— Des cellules TCD4<sup>+</sup> ont été enrichies à partir de la rate et les ganglions de souris C57/BL6 par déplétion des cellules NK et CD8 en utilisant des billes magnétiques suivant le protocole proposé par le manufacturier (StemCell Technologies Inc.). Les cellules TCD4<sup>+</sup> purifiées ( $5 \times 10^6$  cellules) ont été stimulées par la suite

dans des plaques recouvertes par un anticorps anti-CD3 adsorbé et anti-CD28 soluble (les deux à 1 µg/ml, BD Biosciences) pendant 96 h à 37°C dans des conditions favorisant la différenciation des cellules Th17 soit en présence d'anti-IL4 et anti-IFN $\gamma$  (les deux à 10 µg/ml, BD Biosciences) en présence des concentrations indiquées des cytokines: IL-6, TGF- $\beta$ , IL-27, et EBI3. Au jour 4, les cellules ont été restimulées avec la PMA (50 ng/ml) et de la ionomycine (1 µg/ml) pendant 4h à 37°C. Durant les dernières 2h, la sécrétion des cytokines a été bloquée par la brefeldin A (5µg/ml). Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été marquées pendant 1h à température ambiante en présence d'anticorps anti-CD4-FITC, anti-INF- $\gamma$ -APC et anti-IL-17-PE pour l'analyse de l'expression d'INF- $\gamma$  et IL-17 ou anti-CD4-APC et anti-GM-CSF-PE pour l'analyse de l'expression du GM-CSF. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

***Essais de chromatographie de filtration sur gel***—Les lipoprotéines VLDL et LDL (40 µg, AlfaAesar, ThermoFisher Scientific) ont été incubées à 37°C pendant 1h en présence de 5 µg hCLCF1 biotinylé par EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (ThermoFisher Scientific). Le mélange a été purifié par chromatographie de filtration sur gel de Sephacryl S-100 (GE Healthcare) en présence de 0.1% lysozyme, pH3. En total, 26 fractions (200 µl chaque) ont été collectées. 20 µl de chaque fraction a été analysée par SDS page en coloration directe pour détecter des différentes lipoprotéines (1µg de BSA a été utilisé comme contrôle positif). La détection du CLCF1 a été analysée par immunobavargade de type «western blot» en utilisant la streptavidine marquée à la HRP (20 ng du CLCF1 a été utilisé comme contrôle positif).

## **Résultats et discussion**

***Les cellules B9 ne répondent pas à l'IL-35***—Dans la première partie de la thèse, nous avons démontré la formation d'un nouveau complexe entre l'EBI3 et l'IL-6. Les premières expériences ont démontré une prolifération des cellules B9 en présence d'EBI3. Nous avons interprété ces résultats par la formation d'un complexe autre que l'IL-27. EBI3 pourrait induire la formation de la cytokine IL-35. Nous avons premièrement évalué l'expression de la sous-

unité p35 par les cellules B9. Nous avons observé que les cellules B9 ne produisent pas la sous-unité p35. Pour confirmer ces résultats, nous avons examiné la réponse des cellules B9 en présence de l'IL-35. Nos observations n'ont indiqué aucune prolifération de ces cellules en réponse à l'IL-35.

***Les cellules B9 expriment plus de l'IL-6 par rapport aux cellules B9/IL-27R***— En présence d'EBI3, une réponse plus élevée des cellules B9 en comparaison avec les cellules B9/IL-27R a été remarquée. On a donc examiné l'expression endogène de l'IL-6 et du récepteur gp130 membranaire (figure x). Aucune différence n'a été observée concernant l'expression du récepteur gp130, par contre, les cellules B9 expriment plus de l'IL-6 par rapport aux B9/IL-27R. Ceci suggère que la réponse plus élevée des cellules B9 pourrait être due à une formation plus importante du complexe entre l'IL-6 et l'EBI3.

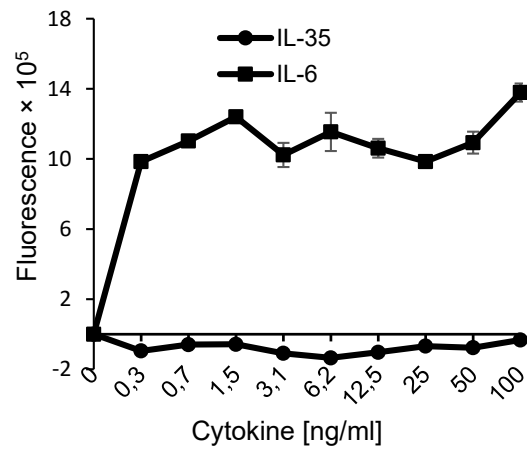
***EBI3 induit l'activation de la voie STAT1 en absence de l'IL-6 sur les cellules TCD4<sup>+</sup>***—Nos études ont également indiqué que l'EBI3 active la voie STAT3 sur les cellules B9 en conjonction avec l'IL-6. Pour exclure le fait que ces observations soient restreintes aux cellules B9, on a également examiné l'activation de la voie STAT3 sur les cellules TCD4<sup>+</sup>. Nous avons observé que l'EBI3 active la voie STAT1 (figure x) et STAT3 (figure x du papier) sur les cellules TCD4<sup>+</sup>. Contrairement à la voie STAT3 qui a lieu en conjonction avec l'IL-6 (figure x du papier), la voie STAT1 est toujours activée en présence d'un anticorps anti-IL-6 (figure x). L'induction de la voie STAT1 suggère donc que l'EBI3 pourrait induire la formation d'un autre complexe qui n'implique pas l'IL-6.

***EBI3 induit l'activation de la voie STAT1 et STAT3 sur les cellules TCD4<sup>+</sup> IL-27R<sup>-/-</sup>***—L'utilisation des souris déficientes en IL-27R $\alpha$  a pour but d'exclure les effets reliés à la formation du complexe entre l'EBI3 et la sous-unité p28 qui pourrait être secrété dans le milieu de culture. Nos résultats indiquent une activation de la voie STAT1 et STAT3 sur les cellules TCD4<sup>+</sup> chez les souris IL-27R $\alpha$ <sup>-/-</sup>. Ces résultats corrélerent avec nos observations obtenues avec les cellules B9 et confirment que EBI3 peut activer la voie STAT3 d'une manière indépendante de p28 et donc de la formation d'un complexe de type IL-27.



***EBI3 induit la différenciation des cellules Th1 et diminue la production du GM-CSF***— Suite aux résultats observés de l'EBI3 sur l'activation de la voie STAT1 et STAT3 sur les cellules TCD4<sup>+</sup>, nous avons voulu savoir si l'EBI3 pourrait induire des activités biologiques sur les cellules TCD4<sup>+</sup>. Nous avons étudié l'effet de l'EBI3 sur la différenciation des cellules TCD4<sup>+</sup> en Th1 (examiné par la production d'INF- $\gamma$ ) et Th17 (examiné par la production d'IL-17 et GM-CSF). Nos résultats indiquent que l'EBI3 induit la différenciation des cellules Th1 et diminue la production du GM-CSF connu pour être secrété par les cellules Th17 différenciées. Aucun effet n'a été observé sur l'expression d'IL-17 suggérant que l'EBI3 agit sur les cellules Th17 préalablement différenciées. Ces réponses indiquent des effets anti-inflammatoires de l'EBI3 qui diffèrent des réponses observées en présence de l'IL-6. IL-6 en combinaison avec TGF- $\beta$  induit la différenciation des cellules Th17 et n'a aucun effet sur les cellules Th1, de plus, il a été démontré que la signalisation de l'IL-6 induit la production du GM-CSF.

***Co-élution du CLCF1 avec VLDL et LDL sur une chromatographie de filtration sur gel***— Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons démontré la formation d'un complexe entre CLCF1 et les différentes isoformes d'apoE. Nous avons également observé par la technique de FPLC que CLCF1 co-élué avec les différentes fractions lipidiques, principalement, VLDL et LDL contenues dans le sérum humain et souris. Nous avons voulu confirmer ces résultats en utilisant des lipoprotéines libres. Les lipoprotéines VLDL et LDL ont été incubées en présence ou en absence du CLCF1. Les résultats de "blue de coomasie" indiquent que les VLDL sortent en premiers (fractions 4-5, figure 28) suivis des LDL (fraction 5-6, figure 28). En présence des lipoprotéines, CLCF1 sort dans les mêmes fractions des VLDL et LDL (figure 28) contrairement au CLCF1 seul qui sort dans les dernières fractions (18-26). Ces résultats confirment donc une co-élution du CLCF1 avec les lipoprotéines VLDL et LDL qui pourrait avoir lieu à travers l'apoE ou une autre apolipoprotéine étant donné que les LDL n'expriment pas l'apoE à la surface.



**Figure 23. Les cellules B9 ne répondent pas à l'IL-35**

Les cellules B9 ont été incubées pendant 72h à 37°C en présence d'IL-6 et IL-35 (les deux à 100ng/ml). La prolifération a été mesurée par fluorescence en utilisant l'AlamarBlue®. Les barres d'erreur indiquent l'écart type (SD) des données obtenues en triplicata.

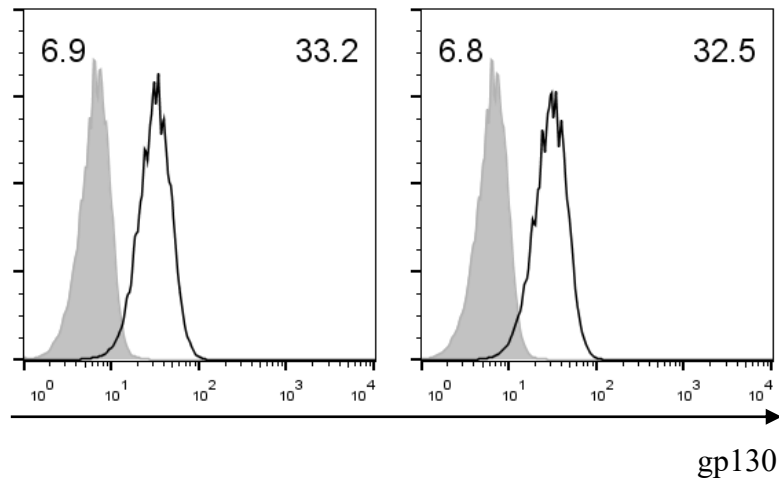
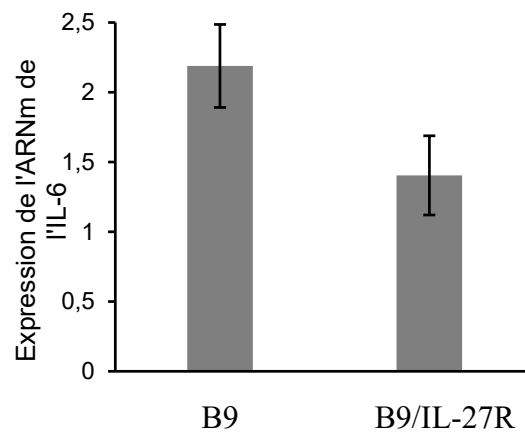
**A****B**

Figure 24. **Analyse de l'expression du récepteur gp130 et de la cytokine IL-6 par les cellules B9 et B9/IL-27R**

(A) L'expression du gp130 à la surface des cellules B9 et B9/IL-27R a été mesurée par marquage direct des cellules avec un anticorps anti-gp130-PE et analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes remplis indiquent les cellules contrôles. Les valeurs de l'intensité moyenne de fluorescence des contrôles (gauche) et des cellules incubées en présence des cytokines (droite) sont indiquées dans les histogrammes. (B) L'expression de l'IL-6 par les cellules B9 et B9/IL-27R a été analysée par RT-PCR en temps réel. Les barres d'erreur indiquent l'écart type (SD) des données obtenues en triplicata.

Cellules T CD4<sup>+</sup>

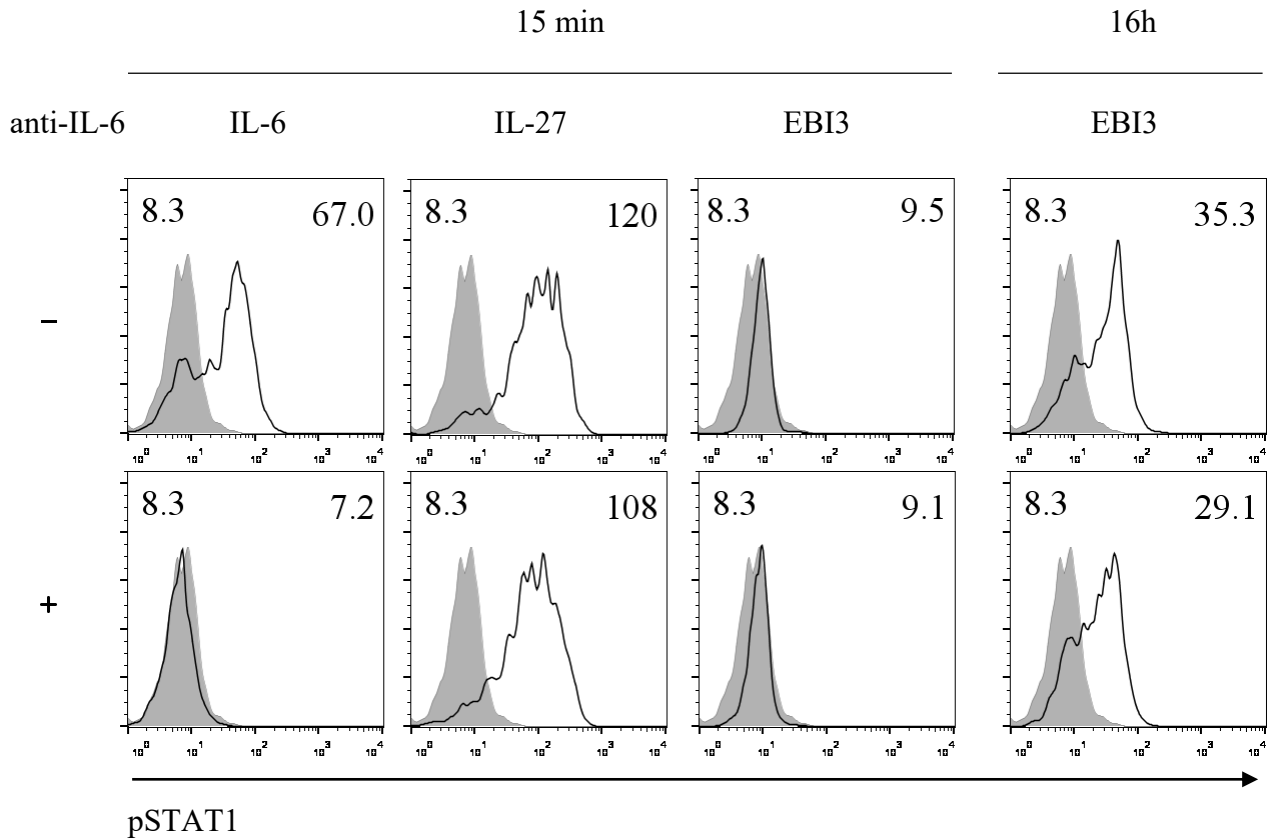
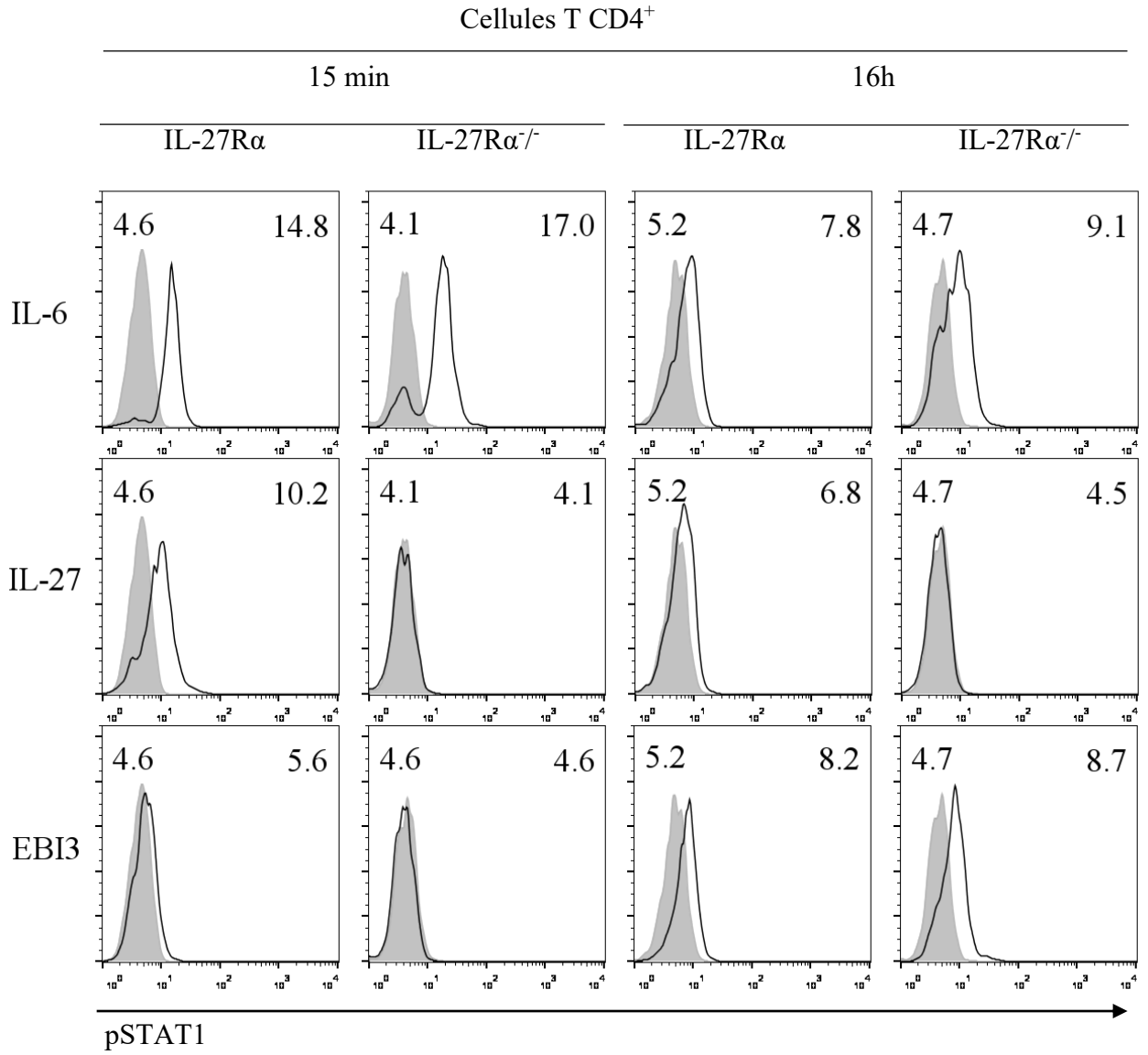


Figure 22. **EBI3 induit l'activation de la voie STAT1 en absence de l'IL-6 sur les cellules TCD4<sup>+</sup>**

Les lymphocytes primaires (10<sup>6</sup> cellules) de souris C57/BL6 ont été incubés pendant 16 h en présence d'EBI3 (1 µg/ml) et pendant 15 minutes en présence d'IL-6 (100 ng/ml), IL-27 (100 ng/ml), ou EBI3 (1 µg/ml) avec ou sans l'anticorps monoclonal anti-IL-6 (10µg/ml). Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CD4 APC et anti-pSTAT1 FITC et analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes remplis indiquent les cellules contrôles. Les valeurs de l'intensité moyenne de fluorescence des contrôles (gauche) et des cellules incubées en présence des cytokines (droite) sont indiquées dans les histogrammes.

A



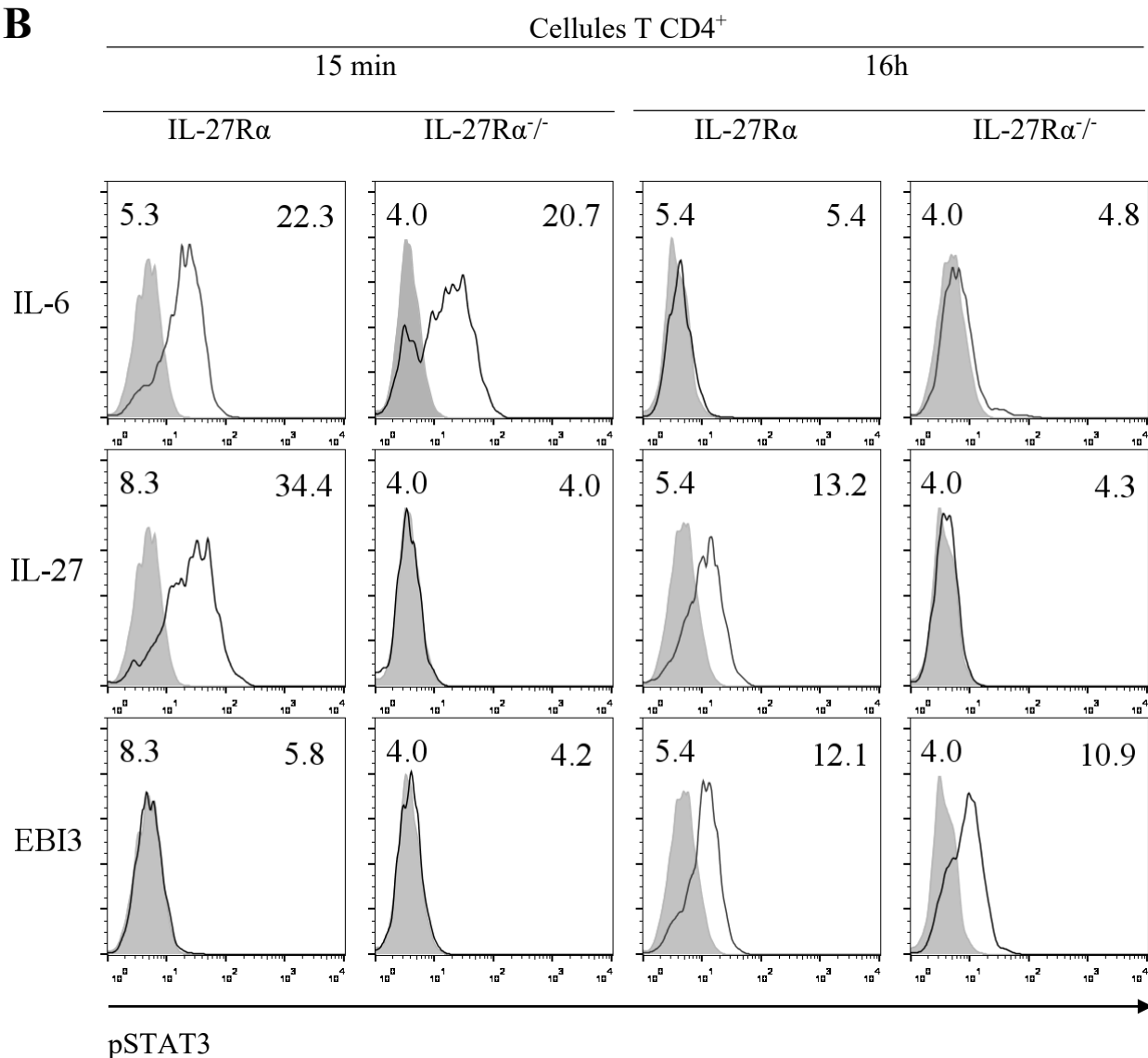
**B**

Figure 23. **EBI3 induit l'activation de la voie STAT1 (A) et STAT3 (B) sur les cellules TCD4<sup>+</sup> des souris IL-27R déficientes**

Les lymphocytes primaires (10<sup>6</sup> cellules) de souris C57/BL6 contrôles ou IL-27R<sup>-/-</sup> ont été incubés pendant 16 h ou 15 min en présence d'EBI3 (1 µg/ml), IL-6 (100 ng/ml), et IL-27 (100 ng/ml). Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été marquées avec un mélange d'anticorps anti-CD4-APC, anti-pSTAT1-FITC, ou anti-pSTAT3-FITC et analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes remplis indiquent les cellules contrôles. Les valeurs de l'intensité moyenne de fluorescence des contrôles (gauche) et des cellules incubées en présence des cytokines (droite) sont indiquées dans les histogrammes.

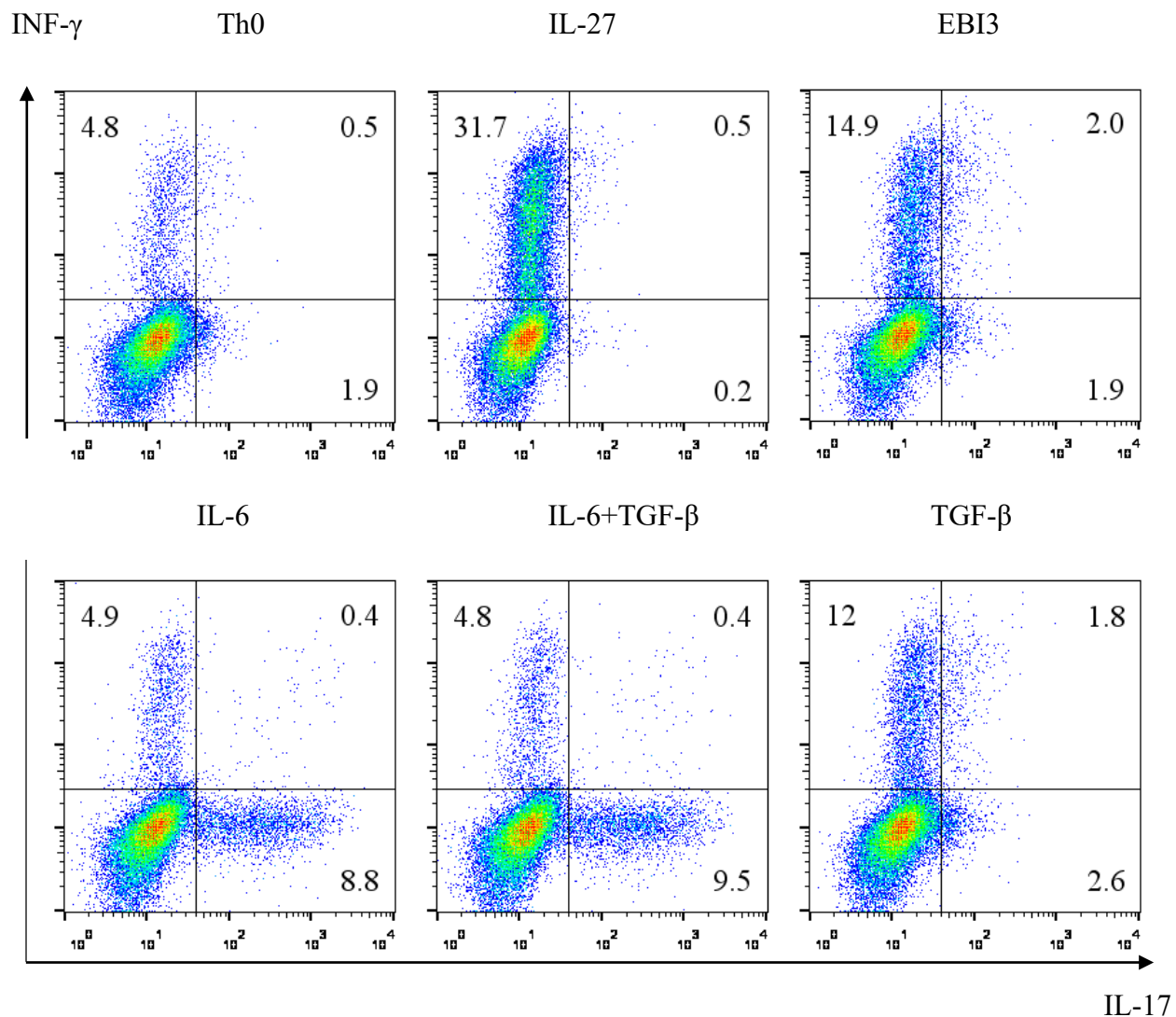


Figure 24. **EBI3 induit la différenciation des cellules Th1**

Des cellules TCD4<sup>+</sup> ( $0,5 \times 10^6$  cellules) ont été enrichies à partir de la rate et les ganglions de souris C57/BL6 et ont ensuite été stimulées pendant 96 h à 37°C par un mélange d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 dans des conditions favorisant la différenciation des cellules Th17 avec ou sans les cytokines IL-6 (20 ng/ml), IL-27 (100 ng/ml), TGF-β (2 ng/ml) et EBI3 (1 μg/ml). Après stimulation à la PMA/IONO, fixation, et perméabilisation, les cellules ont été marquées avec un mélange d'anticorps anti-CD4-FITC, anti-INF-γ-APC et anti-IL-17-PE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées.

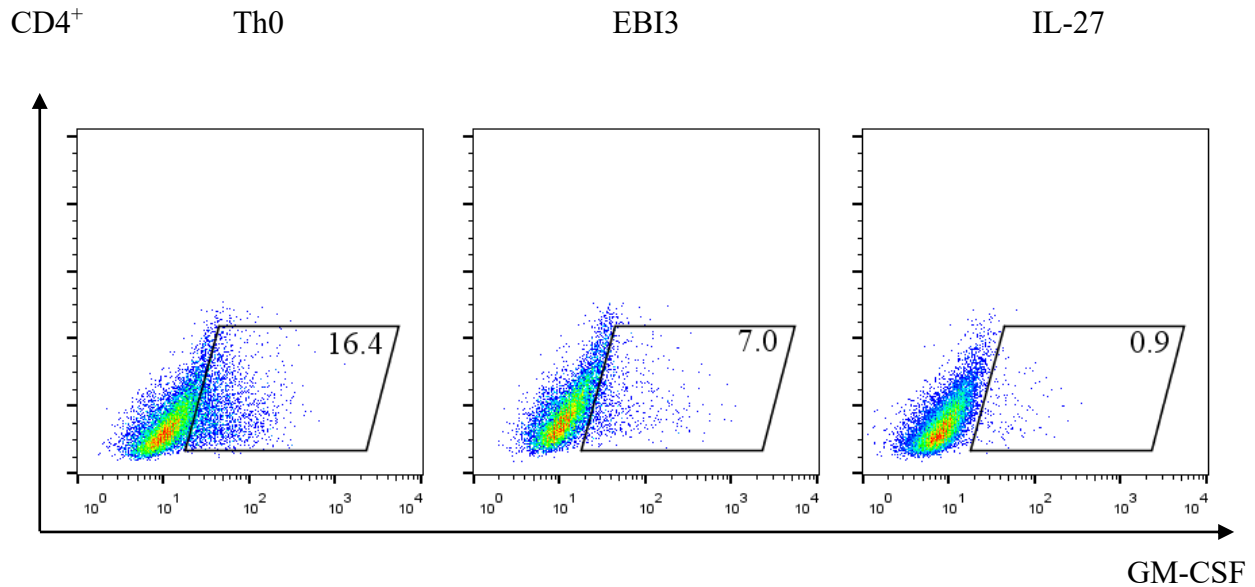
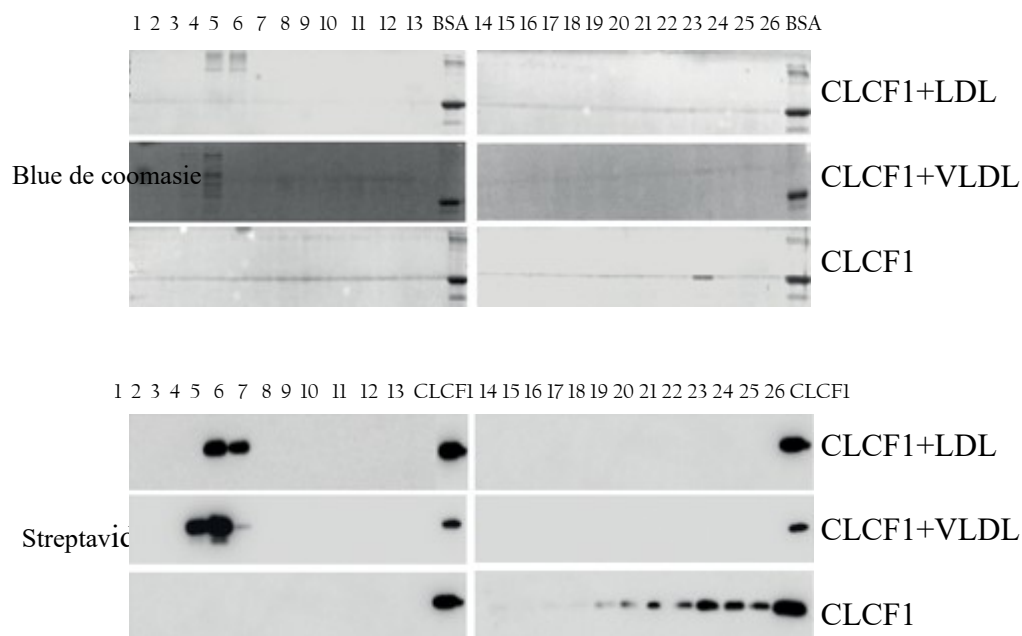


Figure 25. **EBI3 inhibe la production du GM-CSF par les cellules T CD4<sup>+</sup>**

Des cellules TCD4<sup>+</sup> ( $0,5 \times 10^6$  cellules) ont été enrichies à partir de la rate et les ganglions de souris C57/BL6 et ont ensuite été stimulées pendant 96 h à 37°C par un mélange d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 dans des conditions favorisant la différenciation des cellules Th17 avec ou sans les cytokines IL-6 (20 ng/ml), IL-27 (100 ng/ml), TGF- $\beta$  (2 ng/ml) et EBI3 (1  $\mu$ g/ml). Après stimulation à la PMA/IONO, fixation, et perméabilisation, les cellules ont été marquées avec un mélange d'anticorps anti-CD4-FITC et anti-GM-CSF-PE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées.





**Figure 26. Co-élution du CLCF1 avec les lipoprotéines VLDL et LDL**

5  $\mu$ g hCLCF1 biotinyllé a été incubé à 37°C pendant 1 h sans ou en présence des lipoprotéines VLDL et LDL et le mélange a été ensuite purifié par chromatographie de filtration sur gel de Sephacryl S-100. Des fractions (200  $\mu$ l chaque) ont été collectées (indiquée par les chiffres en haut). 20  $\mu$ l de chaque fraction a été analysée par SDS page en coloration directe en Blue de coomasie pour détecter la présence des différentes lipoprotéines. 1  $\mu$ g de la BSA a été utilisé comme contrôle positif (dernier panneau). La détection du CLCF1 a été analysée par immunobavargade de type «western blot» en utilisant la streptavidine marquée à la HRP. 20 ng du CLCF1 a été utilisé comme contrôle positif (dernier panneau).

## Bibliographie

1. Gutman CR, Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Matthew WD. Apolipoprotein E binds to and potentiates the biological activity of ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci.* 1997;17(16):6114-21.
2. Kleine-Tebbe J, Wassmann-Otto A, Monnikes H. [Food Allergy and Intolerance : Distinction, Definitions and Delimitation]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2016;59(6):705-22.
3. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S324-35.
4. Wood P. *Understanding immunology.* Harlow, England ; New York: Pearson Prentice Hall,; 2006. Available from: Connect to MyiLibrary resource <http://www.myilibrary.com?id=106444>.
5. Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate lymphoid cells. *Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology.* *Science.* 2015;348(6237):aaa6566.
6. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.
7. Adalid-Peralta L, Fragoso G, Fleury A, Sciutto E. Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections. *Int J Biol Sci.* 2011;7(9):1412-26.
8. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science.* 1995;268(5208):251-5.
9. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S34-45.
10. Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today.* 1990;11(10):350-4.
11. Davies DR, Wlodawer A. Cytokines and their receptor complexes. *FASEB J.* 1995;9(1):50-6.
12. Bazan JF. Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell.* 1990;61(5):753-4.
13. Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S, Murakami M, Yamasaki K, Hibi M, et al. 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.* 1993;12(4):1705-12.
14. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 8):1281-3.
15. Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins. *Keio J Med.* 2009;58(2):73-83.
16. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1169-76.
17. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* 1999;18(5):1309-20.

18. Yamamoto K, Yamaguchi M, Miyasaka N, Miura O. SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310(4):1188-93.
19. Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science.* 1999;286(5443):1374-7.
20. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15(1):11-8.
21. Brennan P, Babbage JW, Burgering BM, Groner B, Reif K, Cantrell DA. Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity.* 1997;7(5):679-89.
22. Ahmad F, Gao G, Wang LM, Landstrom TR, Degerman E, Pierce JH, et al. IL-3 and IL-4 activate cyclic nucleotide phosphodiesterases 3 (PDE3) and 4 (PDE4) by different mechanisms in FDCP2 myeloid cells. *J Immunol.* 1999;162(8):4864-75.
23. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(7):521-31.
24. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003;19(5):641-4.
25. Wang X, Wei Y, Xiao H, Liu X, Zhang Y, Han G, et al. A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *Eur J Immunol.* 2016;46(6):1343-50.
26. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):1-20.
27. Eulendorf R, Dittrich A, Khouri C, Muller PJ, Mutze B, Wolf A, et al. Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(6-7):486-95.
28. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science.* 1992;255(5042):306-12.
29. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(5):878-88.
30. Jones LL, Vignali DA. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol Res.* 2011;51(1):5-14.
31. Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science.* 2003;300(5628):2101-4.
32. Hammacher A, Richardson RT, Layton JE, Smith DK, Angus LJ, Hilton DJ, et al. The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem.* 1998;273(35):22701-7.
33. Boulanger MJ, Bankovich AJ, Kortemme T, Baker D, Garcia KC. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Mol Cell.* 2003;12(3):577-89.
34. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 1986;324(6092):73-6.
35. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science.* 1988;241(4867):825-8.

36. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):847-50.
37. Yamaji H, Iizasa T, Koh E, Suzuki M, Otsuji M, Chang H, et al. Correlation between interleukin 6 production and tumor proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(9):786-92.
38. Ward LD, Hammacher A, Howlett GJ, Matthews JM, Fabri L, Moritz RL, et al. Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6.receptor complex. *J Biol Chem.* 1996;271(33):20138-44.
39. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1237-47.
40. Vollmer P, Walev I, Rose-John S, Bhakdi S. Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. *Infect Immun.* 1996;64(9):3646-51.
41. Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, et al. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood.* 2007;110(6):1748-55.
42. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* 1989;58(3):573-81.
43. Scheller J, Rose-John S. The interleukin 6 pathway and atherosclerosis. *Lancet.* 2012;380(9839):338.
44. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, et al. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol.* 1997;15(2):142-5.
45. Audet J, Miller CL, Rose-John S, Piret JM, Eaves CJ. Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1757-62.
46. Klouche M, Bhakdi S, Hemmes M, Rose-John S. Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor. *J Immunol.* 1999;163(8):4583-9.
47. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 2006;80(2):227-36.
48. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 1997;6(3):315-25.
49. Jostock T, Mullberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, et al. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem.* 2001;268(1):160-7.
50. Lissilaa R, Buatois V, Magistrelli G, Williams AS, Jones GW, Herren S, et al. Although IL-6 trans-signaling is sufficient to drive local immune responses, classical IL-6 signaling is obligate for the induction of T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol.* 2010;185(9):5512-21.

51. Lacroix M, Rousseau F, Guilhot F, Malinge P, Magistrelli G, Herren S, et al. Novel Insights into Interleukin 6 (IL-6) Cis- and Trans-signaling Pathways by Differentially Manipulating the Assembly of the IL-6 Signaling Complex. *J Biol Chem*. 2015;290(45):26943-53.
52. Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Mullberg J, Wolf E, et al. The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J Exp Med*. 1996;183(4):1399-406.
53. van Dam M, Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Brakenhoff JP, Graeve L, et al. Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding. *J Biol Chem*. 1993;268(20):15285-90.
54. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(20):7251-5.
55. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*. 2002;8(1):75-9.
56. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science*. 1994;264(5158):561-3.
57. Zhang H, Neuhofer P, Song L, Rabe B, Lesina M, Kurkowski MU, et al. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1019-31.
58. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009;15(2):103-13.
59. Spehlmann ME, Manthey CF, Dann SM, Hanson E, Sandhu SS, Liu LY, et al. Trp53 deficiency protects against acute intestinal inflammation. *J Immunol*. 2013;191(2):837-47.
60. Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*. 2014;15(5):423-30.
61. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-8.
62. McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, et al. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9589-94.
63. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*. 2000;1(6):510-4.
64. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. 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*. 2000;6(5):583-8.

65. Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, Kosco-Vilbois MH. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med.* 1998;188(10):1895-906.
66. Nishimoto N, Sasai M, Shima Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Shirai T, et al. Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood.* 2000;95(1):56-61.
67. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. *Nat Med.* 2014;20(11):1334-9.
68. Briso EM, Dienz O, Rincon M. Cutting edge: soluble IL-6R is produced by IL-6R ectodomain shedding in activated CD4 T cells. *J Immunol.* 2008;180(11):7102-6.
69. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1363-71.
70. Daudelin JF, Mathieu M, Boulet S, Labrecque N. IL-6 production by dendritic cells is dispensable for CD8+ memory T-cell generation. *Biomed Res Int.* 2013;2013:126189.
71. Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, et al. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol.* 2007;179(4):2041-5.
72. DeLeo FR. Attractive shedding. *Blood.* 2007;110(6):1711-2.
73. Jin JO, Han X, Yu Q. Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J Autoimmun.* 2013;40:28-44.
74. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(3):349-56.
75. Febbraio MA, Rose-John S, Pedersen BK. Is interleukin-6 receptor blockade the Holy Grail for inflammatory diseases? *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(4):396-8.
76. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes.* 2006;55(10):2688-97.
77. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 2003;24(1):25-9.
78. Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47(11):1635-40.
79. Tilg H, Moschen AR, Kaser A, Pines A, Dotan I. Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut.* 2008;57(5):684-94.
80. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11535-40.
81. Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun.* 2001;69(2):744-50.
82. Zhang GJ, Adachi I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res.* 1999;19(2B):1427-32.

83. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1248-53.
84. Schafer ZT, Brugge JS. IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3660-3.
85. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, Camiolo M, Stiles B, Lindsted T, et al. TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(35):15535-40.
86. Ara T, Nakata R, Sheard MA, Shimada H, Buettner R, Groshen SG, et al. Critical role of STAT3 in IL-6-mediated drug resistance in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 2013;73(13):3852-64.
87. Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, et al. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(24):8851-8.
88. Liu Y, Li PK, Li C, Lin J. Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells. *J Biol Chem.* 2010;285(35):27429-39.
89. Fulciniti M, Hideshima T, Vermot-Desroches C, Pozzi S, Nanjappa P, Shen Z, et al. A high-affinity fully human anti-IL-6 mAb, 1339, for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7144-52.
90. Chen R, Chen B. Siltuximab (CNTO 328): a promising option for human malignancies. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3455-8.
91. Boekholdt SM, Stroes ES. The interleukin-6 pathway and atherosclerosis. *Lancet.* 2012;379(9822):1176-8.
92. Ferreira RC, Freitag DF, Cutler AJ, Howson JM, Rainbow DB, Smyth DJ, et al. Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLoS Genet.* 2013;9(4):e1003444.
93. Abou-Auda HS, Sakr W. Tocilizumab: A new anti-rheumatic drug. *Saudi Pharm J.* 2010;18(4):257-9.
94. Tanaka T, Narazaki M, Ogata A, Kishimoto T. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Semin Immunol.* 2014;26(1):88-96.
95. Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, Dikranian A, Alten R, Pavelka K, et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet.* 2013;381(9877):1541-50.
96. Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, et al. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology.* 2014;82(15):1302-6.
97. Kurzrock R, Voorhees PM, Casper C, Furman RR, Fayad L, Lonial S, et al. A phase I, open-label study of siltuximab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, or Castleman disease. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3659-70.
98. Cutolo M, Meroni M. Clinical utility of the oral JAK inhibitor tofacitinib in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Inflamm Res.* 2013;6:129-37.
99. Smolen JS, Weinblatt ME, Sheng S, Zhuang Y, Hsu B. Sirukumab, a human anti-interleukin-6 monoclonal antibody: a randomised, 2-part (proof-of-concept and dose-finding),

- phase II study in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1616-25.
100. Hoge J, Yan I, Janner N, Schumacher V, Chalaris A, Steinmetz OM, et al. IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. *J Immunol.* 2013;190(2):703-11.
101. Sodenkamp J, Waetzig GH, Scheller J, Seegert D, Grotzinger J, Rose-John S, et al. Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis. *Immunobiology.* 2012;217(10):996-1004.
102. Schuett H, Oestreich R, Waetzig GH, Annema W, Luchtefeld M, Hillmer A, et al. Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(2):281-90.
103. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, et al. The IL-6R alpha chain controls lung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest.* 2005;115(2):313-25.
104. Kahlenberg JM, Fox DA. Advances in the medical treatment of rheumatoid arthritis. *Hand Clin.* 2011;27(1):11-20.
105. Lang VR, Englbrecht M, Rech J, Nusslein H, Manger K, Schuch F, et al. Risk of infections in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51(5):852-7.
106. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity.* 2002;16(6):779-90.
107. Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, et al. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol.* 2005;174(5):2814-24.
108. Villarino AV, Huang E, Hunter CA. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol.* 2004;173(2):715-20.
109. Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, et al. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol.* 1996;70(2):1143-53.
110. Kuppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(10):801-12.
111. Devergne O, Cahir McFarland ED, Mosialos G, Izumi KM, Ware CF, Kieff E. Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol.* 1998;72(10):7900-8.
112. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Hermine A, Devergne O. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol.* 2008;181(10):6898-905.
113. Devergne O, Coulomb-L'Hermine A, Capel F, Moussa M, Capron F. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pathol.* 2001;159(5):1763-76.
114. Larousserie F, Bardel E, Pflanz S, Arnulf B, Lome-Maldonado C, Hermine O, et al. Analysis of interleukin-27 (EB13/p28) expression in Epstein-Barr virus- and human T-cell



- leukemia virus type 1-associated lymphomas: heterogeneous expression of EB13 subunit by tumoral cells. *Am J Pathol.* 2005;166(4):1217-28.
115. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18):6934-8.
116. Nieuwenhuis EE, Neurath MF, Corazza N, Iijima H, Trgovcich J, Wirtz S, et al. Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(26):16951-6.
117. Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity.* 2012;37(6):960-9.
118. Pandey D. Jaundice after radical cholecystectomy and bile duct resection: a case of postoperative acute viral hepatitis a confounding the clinical picture. *Indian J Surg Oncol.* 2011;2(3):210-1.
119. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol.* 2004;172(4):2225-31.
120. Yoshida H, Nakaya M, Miyazaki Y. Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. *J Leukoc Biol.* 2009;86(6):1295-303.
121. Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol.* 2003;170(10):4886-90.
122. Diegelmann J, Olszak T, Goke B, Blumberg RS, Brand S. A novel role for interleukin-27 (IL-27) as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential signal transducer and activator of transcription (STAT) protein signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins. *J Biol Chem.* 2012;287(1):286-98.
123. Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol.* 2006;177(11):7579-87.
124. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006;7(9):937-45.
125. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(21):10188-92.
126. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996;383(6603):787-93.
127. Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(25):15047-52.
128. Hunter CA, Villarino A, Artis D, Scott P. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol Rev.* 2004;202:106-14.
129. Holscher C, Holscher A, Ruckerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T, et al. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol.* 2005;174(6):3534-44.

130. Goldberg R, Wildbaum G, Zohar Y, Maor G, Karin N. Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol.* 2004;173(2):1171-8.
131. Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Takeda K, Fukai F, Mizuguchi J, et al. IL-27 suppresses CD28-mediated [correction of medicated] IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol.* 2006;176(5):2773-80.
132. Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1372-9.
133. Miyazaki Y, Inoue H, Matsumura M, Matsumoto K, Nakano T, Tsuda M, et al. Exacerbation of experimental allergic asthma by augmented Th2 responses in WSX-1-deficient mice. *J Immunol.* 2005;175(4):2401-7.
134. Shimizu S, Sugiyama N, Masutani K, Sadanaga A, Miyazaki Y, Inoue Y, et al. Membranous glomerulonephritis development with Th2-type immune deviations in MRL/lpr mice deficient for IL-27 receptor (WSX-1). *J Immunol.* 2005;175(11):7185-92.
135. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 2009;183(4):2435-43.
136. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, et al. IL-27 Blocks ROR $\gamma$ c Expression to Inhibit Lineage Commitment of Th17 Cells. *Journal of Immunology.* 2009;182(9):5748-56.
137. Young A, Linehan E, Hams E, O'Hara Hall AC, McClurg A, Johnston JA, et al. Cutting edge: suppression of GM-CSF expression in murine and human T cells by IL-27. *J Immunol.* 2012;189(5):2079-83.
138. Huber M, Steinwald V, Guralnik A, Brustle A, Kleemann P, Rosenplanter C, et al. IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int Immunol.* 2008;20(2):223-34.
139. Morishima N, Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Augmentation of effector CD8<sup>+</sup> T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J Immunol.* 2005;175(3):1686-93.
140. Liu Z, Liu JQ, Talebian F, Wu LC, Li S, Bai XF. IL-27 enhances the survival of tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells and programs them into IL-10-producing, memory precursor-like effector cells. *Eur J Immunol.* 2013;43(2):468-79.
141. Larousserie F, Charlot P, Bardel E, Froger J, Kastelein RA, Devergne O. Differential effects of IL-27 on human B cell subsets. *J Immunol.* 2006;176(10):5890-7.
142. Hu S, Wong CK, Lam CW. Activation of eosinophils by IL-12 family cytokine IL-27: Implications of the pleiotropic roles of IL-27 in allergic responses. *Immunobiology.* 2011;216(1-2):54-65.
143. Liu FD, Kenngott EE, Schroter MF, Kuhl A, Jennrich S, Watzlawick R, et al. Timed action of IL-27 protects from immunopathology while preserving defense in influenza. *PLoS Pathog.* 2014;10(5):e1004110.
144. Laroni A, Gandhi R, Beynon V, Weiner HL. IL-27 imparts immunoregulatory function to human NK cell subsets. *PLoS One.* 2011;6(10):e26173.
145. McHedlidze T, Kindermann M, Neves AT, Voehringer D, Neurath MF, Wirtz S. IL-27 suppresses type 2 immune responses in vivo via direct effects on group 2 innate lymphoid cells. *Mucosal Immunol.* 2016.

146. Fu X, Xiao J, Wei Y, Li S, Liu Y, Yin J, et al. Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell Res.* 2015;25(6):655-73.
147. Furusawa J, Mizoguchi I, Chiba Y, Hisada M, Kobayashi F, Yoshida H, et al. Promotion of Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells by Interleukin-27 into Myeloid Progenitors to Control Infection in Emergency Myelopoiesis. *PLoS Pathog.* 2016;12(3):e1005507.
148. Yao L, Wang M, Niu Z, Liu Q, Gao X, Zhou L, et al. Interleukin-27 inhibits malignant behaviors of pancreatic cancer cells by targeting M2 polarized tumor associated macrophages. *Cytokine.* 2016.
149. Nam H, Ferguson BS, Stephens JM, Morrison RF. Modulation of IL-27 in adipocytes during inflammatory stress. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(1):157-66.
150. Stumhofer JS, Tait ED, Quinn WJ, 3rd, Hosken N, Spudy B, Goenka R, et al. A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling. *Nat Immunol.* 2010;11(12):1119-26.
151. Wang RX, Yu CR, Mahdi RM, Egwuagu CE. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *J Biol Chem.* 2012;287(43):36012-21.
152. Tormo AJ, Meliani Y, Beaupre LA, Sharma M, Fritz JH, Elson G, et al. The composite cytokine p28/cytokine-like factor 1 sustains B cell proliferation and promotes plasma cell differentiation. *J Immunol.* 2013;191(4):1657-65.
153. Crabe S, Guay-Giroux A, Tormo AJ, Duluc D, Lissilaa R, Guilhot F, et al. The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling. *J Immunol.* 2009;183(12):7692-702.
154. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol.* 2009;182(9):5748-56.
155. Pot C, Apetoh L, Awasthi A, Kuchroo VK. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. *Semin Immunol.* 2011;23(6):438-45.
156. Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, et al. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;179(5):3268-75.
157. Senecal V, Deblois G, Beauseigle D, Schneider R, Brandenburg J, Newcombe J, et al. Production of IL-27 in multiple sclerosis lesions by astrocytes and myeloid cells: Modulation of local immune responses. *Glia.* 2016;64(4):553-69.
158. Niedbala W, Cai B, Wei X, Patakas A, Leung BP, McInnes IB, et al. Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(10):1474-9.
159. Shibata S, Tada Y, Asano Y, Yanaba K, Sugaya M, Kadono T, et al. IL-27 activates Th1-mediated responses in imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions. *J Invest Dermatol.* 2013;133(2):479-88.
160. Dong Z, Zhao X, Tai W, Lei W, Wang Y, Li Z, et al. IL-27 attenuates the TGF-beta1-induced proliferation, differentiation and collagen synthesis in lung fibroblasts. *Life Sci.* 2016;146:24-33.
161. Bullock TN. IL-27 and the generation of CD8+ T-cell responses to peptide vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(47):16639-40.

162. Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, Back TC, Hixon JA, Hahn C, et al. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: Role for CD8(+) T cells. *Journal of Immunology*. 2004;173(12):7170-82.
163. Chiyo M, Shimozato O, Iizasa T, Fujisawa T, Tagawa M. Antitumor effects produced by transduction of dendritic cells-derived heterodimeric cytokine genes in murine colon carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2004;24(6):3763-7.
164. Salcedo R, Hixon JA, Stauffer JK, Jalah R, Brooks AD, Khan T, et al. Immunologic and therapeutic synergy of IL-27 and IL-2: enhancement of T cell sensitization, tumor-specific CTL reactivity and complete regression of disseminated neuroblastoma metastases in the liver and bone marrow. *J Immunol*. 2009;182(7):4328-38.
165. Shimizu M, Shimamura M, Owaki T, Asakawa M, Fujita K, Kudo M, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. *J Immunol*. 2006;176(12):7317-24.
166. Ho MY, Leu SJ, Sun GH, Tao MH, Tang SJ, Sun KH. IL-27 directly restrains lung tumorigenicity by suppressing cyclooxygenase-2-mediated activities. *J Immunol*. 2009;183(10):6217-26.
167. Zolochovska O, Ellis J, Parelkar S, Chan-Seng D, Emrick T, Wei J, et al. Interleukin-27 gene delivery for modifying malignant interactions between prostate tumor and bone. *Hum Gene Ther*. 2013;24(12):970-81.
168. Devergne O, Birkenbach M, Kieff E. 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*. 1997;94(22):12041-6.
169. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014;507(7492):366-70.
170. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*. 2014;20(6):633-41.
171. Collison LW, Delgoffe GM, Guy CS, Vignali KM, Chaturvedi V, Fairweather D, et al. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol*. 2012;13(3):290-9.
172. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*. 2012;13(8):722-8.
173. Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006;54(1):15-24.
174. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.
175. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1093-101.
176. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, et al. 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*. 2007;37(11):3021-9.
177. Tedder TF. B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. *J Immunol*. 2015;194(4):1395-401.

178. Thiolat A, Denys A, Petit M, Biton J, Lemeiter D, Herve R, et al. Interleukin-35 gene therapy exacerbates experimental rheumatoid arthritis in mice. *Cytokine*. 2014;69(1):87-93.
179. Jafarzadeh A, Jamali M, Mahdavi R, Ebrahimi HA, Hajghani H, Khosravimashizi A, et al. Circulating levels of interleukin-35 in patients with multiple sclerosis: evaluation of the influences of FOXP3 gene polymorphism and treatment program. *J Mol Neurosci*. 2015;55(4):891-7.
180. Wang Z, Liu JQ, Liu Z, Shen R, Zhang G, Xu J, et al. Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis. *J Immunol*. 2013;190(5):2415-23.
181. Shi Y, Wang W, Yourey PA, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J, et al. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;262(1):132-8.
182. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11458-63.
183. Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, et al. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci*. 2000;3(9):867-72.
184. Perret D, Guillet C, Elson G, Froger J, Plun-Favreau H, Rousseau F, et al. Two different contact sites are recruited by cardiotrophin-like cytokine (CLC) to generate the CLC/CLF and CLC/sCNTFR $\alpha$  composite cytokines. *J Biol Chem*. 2004;279(42):43961-70.
185. Lelievre E, Plun-Favreau H, Chevalier S, Froger J, Guillet C, Elson GC, et al. 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*. 2001;276(25):22476-84.
186. Plun-Favreau H, Elson G, Chabbert M, Froger J, deLapeyriere O, Lelievre E, et al. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *EMBO J*. 2001;20(7):1692-703.
187. Vlotides G, Zitzmann K, Stalla GK, Auernhammer CJ. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(5):325-36.
188. DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, et al. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell*. 1995;83(2):313-22.
189. Derouet D, Rousseau F, Alfonsi F, Froger J, Hermann J, Barbier F, et al. Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(14):4827-32.
190. Rousseau F, Chevalier S, Guillet C, Ravon E, Diveu C, Froger J, et al. Ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin-like cytokine, and neuropoietin share a conserved binding site on the ciliary neurotrophic factor receptor alpha chain. *J Biol Chem*. 2008;283(44):30341-50.
191. Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, et al. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science*. 1993;259(5102):1736-9.

192. Larsen JV, Hansen M, Moller B, Madsen P, Scheller J, Nielsen M, et al. Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol Cell Biol.* 2010;30(17):4175-87.
193. Cognet I, Guilhot F, Gabriac M, Chevalier S, Chouikh Y, Herman-Bert A, et al. Cardiotrophin-like cytokine labelling using Bir A biotin ligase: a sensitive tool to study receptor expression by immune and non-immune cells. *J Immunol Methods.* 2005;301(1-2):53-65.
194. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv.* 2000;74(2-3):265-72.
195. Adler R. Ciliary neurotrophic factor as an injury factor. *Curr Opin Neurobiol.* 1993;3(5):785-9.
196. Zou X, Bolon B, Pretorius JK, Kurahara C, McCabe J, Christiansen KA, et al. Neonatal death in mice lacking cardiotrophin-like cytokine is associated with multifocal neuronal hypoplasia. *Vet Pathol.* 2009;46(3):514-9.
197. Forger NG, Prevette D, deLapeyriere O, de Bovis B, Wang S, Bartlett P, et al. Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci.* 2003;23(26):8854-8.
198. Uemura A, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Nakashima K, Taga T. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine.* 2002;18(1):1-7.
199. Bose B, Cattran D, Toronto Glomerulonephritis R. Glomerular diseases: FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(3):626-32.
200. Svarstad E, Bostad L, Kaarboe O, Houge G, Tondel C, Lyngdal PT, et al. Focal and segmental glomerular sclerosis (FSGS) in a man and a woman with Fabry's disease. *Clin Nephrol.* 2005;63(5):394-401.
201. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(11):2115-21.
202. Sharma M, Zhou J, Gauchat JF, Sharma R, McCarthy ET, Srivastava T, et al. Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors attenuate the effect of cardiotrophin-like cytokine factor 1 and human focal segmental glomerulosclerosis serum on glomerular filtration barrier. *Transl Res.* 2015;166(4):384-98.
203. Savin VJ, McCarthy ET, Sharma R, Charba D, Sharma M. Galactose binds to focal segmental glomerulosclerosis permeability factor and inhibits its activity. *Transl Res.* 2008;151(6):288-92.
204. Wada T, Nangaku M. A circulating permeability factor in focal segmental glomerulosclerosis: the hunt continues. *Clin Kidney J.* 2015;8(6):708-15.
205. Last JA, Siefkin AD, Reiser KM. Type I collagen content is increased in lungs of patients with adult respiratory distress syndrome. *Thorax.* 1983;38(5):364-8.
206. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):583-94.
207. Kass DJ, Yu G, Loh KS, Savir A, Borczuk A, Kahloon R, et al. Cytokine-like factor 1 gene expression is enriched in idiopathic pulmonary fibrosis and drives the accumulation of CD4+ T cells in murine lungs: evidence for an antifibrotic role in bleomycin injury. *Am J Pathol.* 2012;180(5):1963-78.

208. Knappskog PM, Majewski J, Livneh A, Nilsen PT, Bringsli JS, Ott J, et al. Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *Am J Hum Genet.* 2003;72(2):375-83.
209. Rousseau F, Gauchat JF, McLeod JG, Chevalier S, Guillet C, Guilhot F, et al. 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.* 2006;103(26):10068-73.
210. Herholz J, Meloni A, Marongiu M, Chiappe F, Deiana M, Herrero CR, et al. Differential secretion of the mutated protein is a major component affecting phenotypic severity in CRLF1-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(5):525-33.
211. Hahn AF, Waaler PE, Kvistad PH, Bamforth JS, Miles JH, McLeod JG, et al. Cold-induced sweating syndrome: CISS1 and CISS2: manifestations from infancy to adulthood. Four new cases. *J Neurol Sci.* 2010;293(1-2):68-75.
212. Crisponi L, Crisponi G, Meloni A, Toliat MR, Nurnberg G, Usala G, et al. Crisponi syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene and is allelic to cold-induced sweating syndrome type 1. *Am J Hum Genet.* 2007;80(5):971-81.
213. Stanke M, Duong CV, Pape M, Geissen M, Burbach G, Deller T, et al. Target-dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp 130 signaling. *Development.* 2006;133(1):141-50.
214. Lee MY, Deller T, Kirsch M, Frotscher M, Hofmann HD. Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J Neurosci.* 1997;17(3):1137-46.
215. Lee DA, Zurawel RH, Windebank AJ. Ciliary neurotrophic factor expression in Schwann cells is induced by axonal contact. *J Neurochem.* 1995;65(2):564-8.
216. Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grotzinger J, et al. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9528-35.
217. Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, Deguchi T. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet.* 1994;7(1):79-84.
218. Purser MJ, Dalvi PS, Wang ZC, Belsham DD. The Cytokine Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Activates Hypothalamic Urocortin-Expressing Neurons Both In Vitro and In Vivo. *Plos One.* 2013;8(4).
219. Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, et al. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol.* 1996;39(2):256-60.
220. Aebischer P, Pochon NA, Heyd B, Deglon N, Joseph JM, Zurn AD, et al. Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogenic cell line engineered to secrete hCNTF. *Hum Gene Ther.* 1996;7(7):851-60.
221. Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, et al. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogenic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med.* 1996;2(6):696-9.
222. Li Y, Tao W, Luo L, Huang D, Kauper K, Stabila P, et al. CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One.* 2010;5(3):e9495.
223. Dutt K, Cao Y, Ezeonu I. Ciliary neurotrophic factor: a survival and differentiation inducer in human retinal progenitors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(7):635-46.

224. Emerich DF, Thanos CG. NT-501: An ophthalmic implant of polymer-encapsulated ciliary neurotrophic factor-producing cells. *Curr Opin Mol Ther.* 2008;10(5):506-15.
225. Zhang K, Hopkins JJ, Heier JS, Birch DG, Halperin LS, Albini TA, et al. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(15):6241-5.
226. Gloaguen I, Costa P, Demartis A, Lazzaro D, Di Marco A, Graziani R, et al. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(12):6456-61.
227. Zvonic S, Cornelius P, Stewart WC, Mynatt RL, Stephens JM. The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2228-35.
228. Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Klein HH, Klein J. Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis. *J Endocrinol.* 2002;173(2):R1-8.
229. Ettinger MP, Littlejohn TW, Schwartz SL, Weiss SR, McIlwain HH, Heymsfield SB, et al. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA.* 2003;289(14):1826-32.
230. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet.* 2009;10(2):109-21.
231. Karadi I, Kostner GM. [The role of apolipoproteins in lipid metabolism]. *Ther Umsch.* 1990;47(6):467-74.
232. Ryan RO, van der Horst DJ. Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annu Rev Entomol.* 2000;45:233-60.
233. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:47.
234. German JB, Smilowitz JT, Zivkovic AM. Lipoproteins: When size really matters. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2006;11(2-3):171-83.
235. van Greevenbroek MM, de Bruin TW. Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis.* 1998;141 Suppl 1:S9-16.
236. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl).* 2002;80(12):753-69.
237. Chen Z, Newberry EP, Norris JY, Xie Y, Luo J, Kennedy SM, et al. ApoB100 is required for increased VLDL-triglyceride secretion by microsomal triglyceride transfer protein in ob/ob mice. *J Lipid Res.* 2008;49(9):2013-22.
238. Campos H, Dreon DM, Krauss RM. Associations of hepatic and lipoprotein lipase activities with changes in dietary composition and low density lipoprotein subclasses. *J Lipid Res.* 1995;36(3):462-72.
239. Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4266-72.
240. Bjorkegren J, Karpe F, Milne RW, Hamsten A. Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density lipoproteins isolated from fasting and postprandial plasma. *J Lipid Res.* 1998;39(7):1412-20.



241. Jiang A, Hu W, Meng H, Gao H, Qiao X. Loss of VLDL receptor activates retinal vascular endothelial cells and promotes angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(2):844-50.
242. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986;232(4746):34-47.
243. Rajman I, Eacho PI, Chowienczyk PJ, Ritter JM. LDL particle size: an important drug target? *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(2):125-33.
244. Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. *J Lipid Res.* 1998;39(6):1263-73.
245. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6184-223.
246. Emerging Risk Factors C, Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA.* 2009;302(18):1993-2000.
247. Zhang DW, Garuti R, Tang WJ, Cohen JC, Hobbs HH. Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):13045-50.
248. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):423-33.
249. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):1987-94.
250. Meurs I, Van Eck M, Van Berkel TJ. High-density lipoprotein: key molecule in cholesterol efflux and the prevention of atherosclerosis. *Curr Pharm Des.* 2010;16(13):1445-67.
251. Nykjaer A, Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol.* 2002;12(6):273-80.
252. Jeon H, Meng W, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol.* 2001;8(6):499-504.
253. Brown MS, Herz J, Goldstein JL. LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature.* 1997;388(6643):629-30.
254. Bu G. The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family. *Int Rev Cytol.* 2001;209:79-116.
255. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):431-8.
256. Rudling M. Hepatic mRNA levels for the LDL receptor and HMG-CoA reductase show coordinate regulation in vivo. *J Lipid Res.* 1992;33(4):493-501.
257. Nimpf J, Schneider WJ. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529(1-3):287-98.

258. Tacke PJ, Teusink B, Jong MC, Harats D, Havekes LM, van Dijk KW, et al. LDL receptor deficiency unmasks altered VLDL triglyceride metabolism in VLDL receptor transgenic and knockout mice. *J Lipid Res.* 2000;41(12):2055-62.
259. Ruiz J, Kouivskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, et al. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res.* 2005;46(8):1721-31.
260. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, et al. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11(4):200-8.
261. Chroni A, Nieland TJ, Kypreos KE, Krieger M, Zannis VI. SR-BI mediates cholesterol efflux via its interactions with lipid-bound ApoE. Structural mutations in SR-BI diminish cholesterol efflux. *Biochemistry.* 2005;44(39):13132-43.
262. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 1996;271(5248):518-20.
263. Jenner JL, Ordovas JM, Lamon-Fava S, Schaefer MM, Wilson PW, Castelli WP, et al. Effects of age, sex, and menopausal status on plasma lipoprotein(a) levels. The Framingham Offspring Study. *Circulation.* 1993;87(4):1135-41.
264. Birjmohun RS, Dallinga-Thie GM, Kuivenhoven JA, Stroes ES, Otvos JD, Wareham NJ, et al. Apolipoprotein A-II is inversely associated with risk of future coronary artery disease. *Circulation.* 2007;116(18):2029-35.
265. Jiang R, Schulze MB, Li T, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB, et al. Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B predict cardiovascular disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(8):1991-7.
266. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(3):472-84.
267. Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(1):203-7.
268. Zuckerman SH, Evans GF, O'Neal L. Cytokine regulation of macrophage apo E secretion: opposing effects of GM-CSF and TGF-beta. *Atherosclerosis.* 1992;96(2-3):203-14.
269. Zhang H, Wu LM, Wu J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:949072.
270. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science.* 1991;252(5014):1817-22.
271. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res.* 1992;33(2):141-66.
272. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem.* 1982;257(5):2518-21.
273. Mahley RW, Rall SC, Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000;1:507-37.

274. Li H, Dhanasekaran P, Alexander ET, Rader DJ, Phillips MC, Lund-Katz S. Molecular mechanisms responsible for the differential effects of apoE3 and apoE4 on plasma lipoprotein-cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(4):687-93.
275. Huang Y, Liu XQ, Rall SC, Jr., Mahley RW. Apolipoprotein E2 reduces the low density lipoprotein level in transgenic mice by impairing lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17483-90.
276. Moriwaki Y, Yamamoto T, Takahashi S, Tsutsumi Z, Higashino K. Apolipoprotein E phenotypes in patients with gout: relation with hypertriglyceridaemia. *Ann Rheum Dis.* 1995;54(5):351-4.
277. Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(3):a006312.
278. Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, et al. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron.* 2007;56(1):66-78.
279. Benhayon D, Magdaleno S, Curran T. Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;112(1-2):33-45.
280. Spuch C, Ortolano S, Navarro C. LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease. *Front Physiol.* 2012;3:269.
281. Liu Q, Trotter J, Zhang J, Peters MM, Cheng H, Bao J, et al. Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *J Neurosci.* 2010;30(50):17068-78.
282. Fazio S, Babaev VR, Burleigh ME, Major AS, Hasty AH, Linton MF. Physiological expression of macrophage apoE in the artery wall reduces atherosclerosis in severely hyperlipidemic mice. *J Lipid Res.* 2002;43(10):1602-9.
283. Stannard AK, Riddell DR, Sacre SM, Tagalakis AD, Langer C, von Eckardstein A, et al. Cell-derived apolipoprotein E (ApoE) particles inhibit vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276(49):46011-6.
284. Riddell DR, Graham A, Owen JS. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J Biol Chem.* 1997;272(1):89-95.
285. Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol.* 2004;173(10):6366-75.
286. Swertfeger DK, Hui DY. Apolipoprotein E receptor binding versus heparan sulfate proteoglycan binding in its regulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *J Biol Chem.* 2001;276(27):25043-8.
287. Horejsi B, Ceska R. Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein(a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis. *Physiol Res.* 2000;49 Suppl 1:S63-9.
288. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(2):106-18.
289. Bird TD. Alzheimer Disease Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.

290. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(15):5644-51.
291. Bruschi M, Catarsi P, Candiano G, Rastaldi MP, Musante L, Scolari F, et al. Apolipoprotein E in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2003;63(2):686-95.
292. Ali K, Middleton M, Pure E, Rader DJ. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res*. 2005;97(9):922-7.
293. Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM, Harmony JA. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol*. 1994;159(2):124-39.
294. Tenger C, Zhou X. Apolipoprotein E modulates immune activation by acting on the antigen-presenting cell. *Immunology*. 2003;109(3):392-7.
295. Yin M, Zhang L, Sun XM, Mao LF, Pan J. Lack of apoE causes alteration of cytokines expression in young mice liver. *Mol Biol Rep*. 2010;37(4):2049-54.
296. Xie JJ, Wang J, Tang TT, Chen J, Gao XL, Yuan J, et al. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice. *Cytokine*. 2010;49(2):185-93.
297. Smith E, Prasad KM, Butcher M, Dobrian A, Kolls JK, Ley K, et al. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2010;121(15):1746-55.
298. Duan H, Li Z, Mazzone T. Tumor necrosis factor-alpha modulates monocyte/macrophage apoprotein E gene expression. *J Clin Invest*. 1995;96(2):915-22.
299. Brand K, Mackman N, Curtiss LK. Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *J Clin Invest*. 1993;91(5):2031-9.
300. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453-61.
301. Vitek MP, Snell J, Dawson H, Colton CA. Modulation of nitric oxide production in human macrophages by apolipoprotein-E and amyloid-beta peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240(2):391-4.
302. Colton CA, Brown CM, Cook D, Needham LK, Xu Q, Czapiga M, et al. APOE and the regulation of microglial nitric oxide production: a link between genetic risk and oxidative stress. *Neurobiol Aging*. 2002;23(5):777-85.
303. Colton CA, Needham LK, Brown C, Cook D, Rasheed K, Burke JR, et al. APOE genotype-specific differences in human and mouse macrophage nitric oxide production. *J Neuroimmunol*. 2004;147(1-2):62-7.
304. Li FQ, Sempowski GD, McKenna SE, Laskowitz DT, Colton CA, Vitek MP. Apolipoprotein E-derived peptides ameliorate clinical disability and inflammatory infiltrates into the spinal cord in a murine model of multiple sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(3):956-65.
305. Wang X, Wei Y, Xiao H, Liu X, Zhang Y, Han G, et al. A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *Eur J Immunol*. 2016.
306. Shimozato O, Sato A, Kawamura K, Chiyo M, Ma G, Li Q, et al. The secreted form of p28 subunit of interleukin (IL)-27 inhibits biological functions of IL-27 and suppresses anti-allogeneic immune responses. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):e816-25.

307. Garbers C, Spudy B, Aparicio-Siegmund S, Waetzig GH, Sommer J, Holscher C, et al. An interleukin-6 receptor-dependent molecular switch mediates signal transduction of the IL-27 cytokine subunit p28 (IL-30) via a gp130 protein receptor homodimer. *J Biol Chem.* 2013;288(6):4346-54.
308. Hill M, Thebault P, Segovia M, Louvet C, Beriou G, Tilly G, et al. Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am J Transplant.* 2011;11(10):2036-45.
309. Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, et al. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4<sup>+</sup> T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4<sup>+</sup> T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol.* 2006;177(8):5377-85.
310. Morishima N, Mizoguchi I, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Shimizu M, et al. A pivotal role for interleukin-27 in CD8<sup>+</sup> T cell functions and generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:605483.
311. Chung Y, Yamazaki T, Kim BS, Zhang Y, Reynolds JM, Martinez GJ, et al. Epstein Barr virus-induced 3 (EBI3) together with IL-12 negatively regulates T helper 17-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003628.
312. Batten M, Kljavin NM, Li J, Walter MJ, de Sauvage FJ, Ghilardi N. Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not FoxP3 in murine T cells. *J Immunol.* 2008;180(5):2752-6.
313. Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2003;23(9):513-22.
314. Jones LL, Chaturvedi V, Uyttenhove C, Van Snick J, Vignali DA. Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. *Mol Immunol.* 2012;51(2):234-44.
315. Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 2004;173(6):3871-7.
316. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* 2011;12(6):568-75.
317. Bottcher JP, Schanz O, Garbers C, Zaremba A, Hegenbarth S, Kurts C, et al. IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cell function. *Cell Rep.* 2014;8(5):1318-27.
318. Nowell MA, Richards PJ, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Topley N, et al. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol.* 2003;171(6):3202-9.
319. Kudo H, Wang Z, Jinnin M, Nakayama W, Inoue K, Honda N, et al. EBI3 Downregulation Contributes to Type I Collagen Overexpression in Scleroderma Skin. *J Immunol.* 2015;195(8):3565-73.
320. Garbers C, Thaiss W, Jones GW, Waetzig GH, Lorenzen I, Guillhot F, et al. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem.* 2011;286(50):42959-70.

321. Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(12):720-7.
322. Saito H, Dhanasekaran P, Baldwin F, Weisgraber KH, Lund-Katz S, Phillips MC. Lipid binding-induced conformational change in human apolipoprotein E. Evidence for two lipid-bound states on spherical particles. *J Biol Chem*. 2001;276(44):40949-54.
323. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240(4852):622-30.
324. Carlo AS. Sortilin, a novel APOE receptor implicated in Alzheimer disease. *Prion*. 2013;7(5):378-82.
325. Larsen JV, Kristensen AM, Pallesen LT, Bauer J, Vaegter CB, Nielsen MS, et al. Cytokine-Like Factor 1, an Essential Facilitator of Cardiotrophin-Like Cytokine:Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alpha Signaling and sorLA-Mediated Turnover. *Mol Cell Biol*. 2016;36(8):1272-86.
326. Christian DA, Hunter CA. Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy. *Immunotherapy*. 2012;4(4):425-41.
327. Crowe S, Turpin SM, Ke F, Kemp BE, Watt MJ. Metabolic remodeling in adipocytes promotes ciliary neurotrophic factor-mediated fat loss in obesity. *Endocrinology*. 2008;149(5):2546-56.



