



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

DE 8352

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
1996

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le **11 Octobre 1996**

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY I
Mention "**Biologie et Santé**"

par

Vincent THIBAUT

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies de
"**Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire**"

Sujet:

Le Récepteur Soluble de l'Interleukine-6 du Rat.
Caractérisation et Expression par Transfert de Gène.



104 026996 4

MEMBRES DU JURY

Juges	:	Mlle A.M. BATT	Professeur (Nancy)
		M. J. GAULDIE	Professeur (Hamilton, CANADA)
		M. P. NETTER	Professeur (Nancy)
		M. B. TERLAIN	Professeur (Nancy)
Rapporteurs	:	Mme G. DURAND	Professeur (Châtenay-Malabry)
		Mlle P. LEMARCHAND	Docteur (Paris)

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON
Vice Doyen : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André	M. MIRJOLET Marcel
Mlle BESSON Suzanne	M. PIERFITTE Maurice
Mlle GIRARD Thérèse	M. RICHARD Georges
M. MEUNIER André	M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M. ATKINSON Jeffrey	Pharmacodynamie
M. BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle BATT Anne Marie	Toxicologie
M. BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M. BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mlle GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M. HENRY Max	Biologie végétale
M. HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M. JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M. KERGOSIEN Yannick	Biophysique - Mathématiques -
M. LABRUDE Pierre	Physiologie
M. LALLOZ Lucien	Chimie organique
M. LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M. LEMAY René	Droit et économie pharmaceutique
M. LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique
M. MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M. MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M. MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M. MORTIER François	Pharmacognosie
M. NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
Mme SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M. SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M. SIEST Gérard	Chimie Biologique
M. VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Chimie Analytique
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M.	CATAU Gérard	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen-
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mle	FAIVRE Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

ASSISTANTS

Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier M. **Patrick NETTER** qui a spontanément accepté de collaborer avec le laboratoire de M. Jack GAULDIE et qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Les qualités humaines et scientifiques de M. **Bernard TERLAIN** ne sont plus à démontrer et ont été depuis de nombreuses années le moteur de mon parcours scientifique. Le support qu'il m'a apporté, va bien au delà du pur conseil scientifique et je le remercie chaleureusement pour tout ce qu'il a pu faire afin que ce travail aboutisse. Je tiens à lui exprimer ici ma plus grande reconnaissance.

Je remercie Mme **Geneviève DURAND** qui a accepté d'être "rapporteur" pour ce travail malgré une notification très tardive et un emploi du temps chargé. Sa compréhension et son dévouement m'ont particulièrement touché.

Mlle **Patricia LEMARCHAND** a gentiment accepté de juger ce travail, je lui suis très reconnaissant pour la spontanéité avec laquelle elle a accueilli cette requête; sa sincérité m'a particulièrement touché et a été un support moral important.

Je remercie Mlle **Anne Marie BATT** qui, bien que prévenue tardivement, a accepté avec gentillesse de faire partie du jury.

Je tiens à remercier aussi toutes les personnes du laboratoire de Pharmacologie de Nancy qui ont agi dans les coulisses, que ce soit au niveau du secrétariat ou au sein même de l'équipe scientifique, et en particulier **Jean-Yves JOUZEAU** et **Pascale GEGOUT-POTTIE** qui m'ont sympathiquement aidé dans les démarches administratives. Leur aide a été très efficace et indispensable, je leur en suis très reconnaissant.

Bien sur, il serait irresponsable de ne pas citer ici ma famille qui a sans doute joué le rôle le plus fondamental dans l'accomplissement de ce travail. Par son support quotidien, et ceci n'est pas un adjectif vain, elle a su me porter au bout de mes peines.

ACKNOWLEDGEMENTS

Saying “thank you” to **Jack GAULDIE** is certainly not enough to express what I really mean. From the beginning of my work in his lab until now, I have gained an amazing experience both at the scientific and human levels. His way to deal with people and problems has been a permanent lesson and will stay forever printed deep in my memories. As far as I can remember, nobody gave me such an opportunity to improve in so many different fields. So, the only words I can find, even though it does not translate exactly what my mind would like to say, would be: “I am very grateful for everything you have done for me, you definitely accomplished something important in my life”.

I would like to thank **Jan-Anders KARLSSON** from **Rhône-Poulenc Rorer (UK)**, who was spontaneously very enthusiastic to support this work, it has been a real pleasure to collaborate with him.

I will always remember the kindness with which people welcomed me and how helpful they were in any circumstances. I would like to thank more particularly : **Margit GESTEIRFER**, for her extreme patience and the time she spent to teach me basics, without her and her kindness, this work would not exist; **Todd BRACIAK**, he taught me the secret of adenoviruses, “the American attitude” and so many other things; **Zhou XING**, all along, his knowledge, strictness, patience and skills were exemplary; **Duncan CHONG**, **Jane Ann SCHROEDER** and **Xueya XING**, without them nothing would exist, they are the wheels of the lab and I could always count on them, their participation to this work is tremendous; **Jean-Michel SALLENAVE**, he gave me continuous support, very helpful advice and taught me the secrets of biochemical purification, **Carl RICHARDS** was always ready to share ideas and give me advice, several discussions were very helpful in the development of this work; **Cindy KRUPS**, always smiling, taught me how to use the baculovirus expression system. Many other people in Jack GAULDIE’s lab have also been involved in this work, sorry to the one I cannot mention.

I would also like to thank people from **Frank GRAHAM**, **Del HARNISH**, **Manel JORDANA**, **Jean MARSHALL** and **Carl RICHARDS**’s labs who were always very willing to share their experience and give me hints. It has always been a pleasure to work among them.

The entire group, working around Jack GAULDIE’s lab, was sort of a magic family that made my stay in Hamilton an unforgettable experience. Thank you to all of them.

Just remember: “*When I first came, it took me two weeks to understand what E. coli meant (with your Canadian accent) and I did not know what a restriction enzyme was...*”

*Le Récepteur Soluble de l'Interleukine-6 du Rat.
Caractérisation et Expression par Transfert de Gène*

*Rat Soluble Interleukin-6 Receptor.
Characterization and Gene Transfer Model of
Expression*

TABLE DES MATIERES

Liste des membres du personnel enseignant.....	2
Remerciements.....	4
Table des matières.....	7
Liste des abréviations utilisées.....	10
1. INTRODUCTION.....	12
2. L'INTERLEUKINE-6 ET SON SYSTEME RECEPTEUR.....	14
2.1. L'interleukine-6.....	14
2.1.1. Historique.....	14
2.1.2. Structure.....	16
2.1.3. Production d'Interleukine-6.....	16
2.1.4. Régulation de la production de l'IL-6	18
2.1.5. Activités biologiques de l'interleukine-6.....	18
2.2. Le récepteur à l'interleukine 6.....	20
2.2.1. Généralités	20
2.2.1.1. Clonage	20
2.2.1.2. Structure.....	22
2.2.1.3. Distribution	24
2.2.2. La gp130, protéine transductrice.....	24
2.2.3. Une protéine transductrice et un récepteur spécifique un nouveau concept.....	25
2.2.4. Mécanismes d'interaction de l'IL-6 et de son récepteur	27
2.2.5. Genèse d'un signal cytoplasmique	28
2.2.6. Signaux intracellulaires induits par l'IL-6.....	29
2.2.6.1. Les "JAK"	29
2.2.6.2. Les "STAT".....	30
2.2.6.3. Les autres voies de signalisation.....	31
2.3. Le récepteur soluble à l'interleukine-6.....	34
2.3.1. Historique et mécanisme d'action	34
2.3.2. Le récepteur soluble à l'IL-6 in vivo, données physiologiques et physiopathologiques.....	35
2.3.3. Le récepteur soluble à l'IL-6 in vitro.....	37
2.3.4. Le récepteur soluble à l'IL-6 in vivo, données expérimentales.....	39
2.3.5. Le récepteur soluble à l'IL-6 un protecteur de l'IL-6?.....	41
2.3.6. Génération du récepteur soluble à l'IL-6.....	42
2.3.6.1. Epissage différentiel.....	42
2.3.6.2. Clivage protéolytique.....	43

3. L'INFLAMMATION ET LA REPONSE HEPATIQUE	45
3.1. Introduction.....	45
3.2. La réaction locale.....	45
3.2.1. Initiation.....	45
3.2.2. Amplification.....	46
3.2.3. Résolution	47
3.3. La réaction hépatique de la phase aiguë.....	48
3.4. Les cytokines apparentées à l'IL-6 (LIF, OM, CNTF, IL-11, CT-1).....	51
 4. LES ADENOVIRUS	 54
4.1. Données générales	54
4.1.1. physiopathologie.....	54
4.1.2. Structure.....	54
4.1.3. Mécanisme infectieux	55
4.1.4. Réplication virale.....	55
4.2. Les adénovirus recombinants.	57
4.2.1. Généralités	57
4.2.2. Construction.....	57
4.2.3. Applications	58
 5. OBJECTIFS DU TRAVAIL PRESENTE	 60
 6. PREMIER ARTICLE	 63
“Characterization and Biological Activities of Recombinant Rat Soluble Interleukin-6 Receptor”	
 7. DEUXIEME ARTICLE.....	 96
“Construction and Characterization of a Replication Deficient Adenovirus Expressing Rat Soluble Interleukin-6 Receptor”	
 8. TROISIEME ARTICLE	 126
“Adenovirus Mediated Gene Transfer of sIL-6R and IL-6 in the Lungs Induces Fibrosis”	
 9. QUATRIEME ARTICLE.....	 149
“Antibodies to Rat Soluble Interleukin-6 Receptor Stimulates B9 Hybridoma Cell Proliferation”	
 10. DISCUSSION.....	 176
 11. PERSPECTIVES	 184
 12. BIBLIOGRAPHIE.....	 186
 SUMMARY.....	 212
RESUME.....	213

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1

Facteurs analogues à l'interleukine-6	15
---	----

Tableau 2

Cellules ayant la propriété de synthétiser de l'interleukine-6	17
--	----

Tableau 3

Principaux médiateurs locaux de l'inflammation.....	46
---	----

Tableau 4

Régulation des protéines de la phase aiguë par divers facteurs	50
--	----

Tableau 5

Activités communes des cytokines "IL-6 like"	53
--	----

Tableau 6

Différences entre les protéines produites par E. coli et les cellules d'insectes.....	177
---	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1

Le récepteur à l'IL-6.....	21
----------------------------	----

Figure 2

Structure tertiaire du récepteur à l'IL-6.....	23
--	----

Figure 3

Les cytokines "IL-6 like" et leurs récepteurs.....	26
--	----

Figure 4

Mécanismes de la transduction du signal par la voie JAK/STAT	32
--	----

Figure 5

l'IL-6 et la transduction du signal.....	33
--	----

Figure 6

La réponse de la phase aiguë et les cytokines.....	49
--	----

Figure 7

Le génome adénoviral.....	56
---------------------------	----

Figure 8

Construction des adénovirus recombinants.....	59
---	----

Liste des abréviations utilisées

AA	: Acide(s) Aminé(s)
ADN	: Acide Désoxy-Ribonucléique
Ag	: Antigène
AMPc	: Adénosine 5' Monophosphate cyclique
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
Ad	: Adénovirus
Ad5.E1.rsIL-6R	: Adénovirus recombinant réplication déficient exprimant le récepteur soluble à l'interleukine-6 de rat
b	: Base
CMV	: Cytomégalovirus
CNTF	: Ciliary Neurotrophic Factor
CRP	: C-Reactive Protein
CSF-1	: Colony Stimulating Factor-1
CT-1	: Cardiotrophin-1
EGF	: Epidermal Growth Factor
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EPO	: Erythropoïétine
gp	: Glycoprotéine
h	: humain
HPV	: Human Papilloma Virus
IFN	: Interféron
Ig	: Immunoglobulines
IL	: Interleukine
IL-6R	: Récepteur à l'interleukine-6
i.p.	: Intra Péritonéal
IPTG	: Isopropyl β .D. Thiogalactopyranoside
i.t.	: Intra Trachéal
JAK	: Janus Kinase ou Just Another Kinase
LIF	: Leukemia Inhibitory Factor
LPS	: Lipopolysaccharide
LT	: Leucotriènes
MLP	: Major Late Promoter
OM	: Oncostatin-M
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Réaction d'amplification en chaîne)
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
p.f.u.	: Plaque Forming Unit
PMA	: Phorbol 12-Myristate 13-Acétate

r	: Rat
s.c.	: Sous Cutané
sIL-6R	: Récepteur soluble à l'interleukine-6
STAT	: Signal Transducer and Activators of Transduction
RAC	: Recombinant DNA Advisory Committee
RT	: Reverse transcription (transcription inverse)
UTR	: Untranslated Terminal Region
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine

1. INTRODUCTION

Que ce soit dans le règne végétal ou animal, et ce depuis des millions d'années, la nature a développé des systèmes de plus en plus sophistiqués afin de préserver chaque espèce. L'être humain ou l'animal n'échappe pas à cette règle et les moyens de préservation qu'il met en jeu n'ont pas encore livré tous leurs secrets.

Tout organisme confronté à une atteinte de son intégrité va mettre en oeuvre des mécanismes de défense plus ou moins élaborés afin de restaurer son état initial. On peut schématiquement dissocier les réactions primaires, peu spécifiques et que l'on pourrait qualifier d'urgentes car mises en oeuvre rapidement et sans discernement précis de l'agent "agresseur", des réactions secondaires au caractère beaucoup plus discriminant et le plus souvent très spécifiques. La **réaction inflammatoire** fait partie de cette seconde classe et fait l'objet d'une régulation extrêmement précise dont les mécanismes ne sont que partiellement connus. La seule certitude, dans des conditions physiologiques, est l'ultime but: la **restauration de l'homéostasie**.

Afin d'orchestrer tous les composants de ces réactions à visée initiale réparatrice, l'organisme a mis en oeuvre un système de communication entre les cellules extrêmement sophistiqué et dont les médiateurs sont communément dénommés "**cytokines**". En règle générale et d'une manière simplifiée, ce sont de petites molécules à structure protéique qui vont agir localement ou à distance et qui, en agissant sur une ou plusieurs cellules cibles, transmettent leurs messages. Leur potentiel impressionnant réside dans le fait qu'elles peuvent agir sur de très nombreuses cibles et ainsi induire différents types de réponse. La cinétique et le lieu de libération dans l'organisme de ces peptides définiront un profil de réponse très précis. Ces propriétés exceptionnelles les ont faites décrire comme **molécules "pléiotropiques"**.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'une des molécules intervenant lors de la phase secondaire de cette réponse restauratrice de l'homéostasie: **l'interleukine-6**

(IL-6). Comme nous le décrirons ultérieurement, cette cytokine, afin d'exprimer ses nombreuses activités, nécessite un récepteur spécifique: le **récepteur à l'IL-6**. Notre travail a consisté à étudier le rôle du **récepteur soluble** à l'IL-6, analogue soluble du récepteur membranaire, *in vitro* puis *in vivo*. Cette étude nous a conduit à utiliser de nombreux **systèmes d'expression** qu'ils soient procaryote (*E. coli*) ou eucaryotes (baculovirus et adénovirus) et nous a fait parcourir un univers s'étendant du gène à l'animal.

Nous nous proposons de faire un rappel des données actuelles sur le système de l'interleukine-6 et de son récepteur puis sur les systèmes d'expression protéiques *in vitro* et *in vivo* avant d'aborder les résultats expérimentaux obtenus.

2. L'INTERLEUKINE-6 ET SON SYSTEME RECEPTEUR

2.1. L'interleukine-6

2.1.1. Historique

Le clonage de l'interleukine-6 a suivi un processus très similaire à celui de nombreuses autres cytokines et en particulier celui de l'IL-1 (pour revue se reporter à (Akira et al., 1993; Castell et al., 1989; Kishimoto, 1989; Le and Vilcek, 1989; Sehgal, 1990; Van Snick, 1990; Wolvekamp and Marquet, 1990; Wong and Clark, 1988)). Dans le cas de l'IL-6, c'est la convergence de travaux dans des domaines très différents qui a finalement donné naissance à une molécule unique (cf. tableau 1).

Le premier domaine était concentré sur la recherche de facteurs antiviraux. Ainsi, la première équipe qui décrivit le clonage de l'IL-6 (sans se douter que cela allait devenir l'IL-6) est celle de Weissenbach qui en 1980 essayait d'isoler l'ADN complémentaire de l'Interféron β 2 à partir de fibroblastes humains stimulés par de l'ARN poly (rI).poly (rC) et du cycloheximide. Dans leur quête pour ce facteur ils purifièrent deux ADNc d'un ARN messenger de 1,3 kb. Le transcrit, une protéine de 26 kDa, fut appelée IFN β 2 du fait de ses propriétés décrites comme antivirales. Deux ans plus tard, l'équipe de Content, alors qu'elle s'intéressait à la même famille d'interférons, isola des ARNm de tailles identiques et la protéine fut dénommée 26K en raison de sa masse moléculaire. Contrairement aux travaux précédents, aucune activité antivirale n'a été retrouvée associée à cette protéine.

Le second domaine fut celui impliquant la caractérisation de facteurs favorisant la synthèse d'immunoglobulines. Hirano et coll. purifièrent puis clonèrent en 1986 un facteur capable de stimuler la synthèse d'Ig par des lymphocytes B activés ou des lignées cellulaires immortalisées par le virus d'Epstein Barr, ils le nommèrent BSF pour B cell Stimulating Factor (ou B Cell Differentiation Factor).

Enfin, une troisième thématique apporta sa contribution à la découverte de cette cytokine, c'est celle qui concernait les facteurs de croissance pour les hybridomes et les plasmacytomes. Plusieurs équipes décrivirent successivement chez la souris puis chez l'homme un certain nombre de facteurs aux propriétés similaires.

Ainsi fut décrit le IL-HP1 par Van Snick, le PCT-GF par Nordan et le HPGF par Van Damme, toutes ces protéines ayant des activités très proches. Il fallut alors attendre les années 87 et 88 pour que les comparaisons de séquences protéiques et nucléotidiques livrent le verdict d'une homologie totale entre tous ces facteurs décrits par des équipes aux optiques différentes. Un peu plus tard l'équipe de Gauldie puis celle d'Andus démontraient que des anticorps dirigés contre cette protéine inhibait la capacité de l'HGF ou Hepatocyte Growth Factor de réguler la synthèse des protéines de la phase aiguë (Andus et al., 1988; Andus et al., 1988; Gauldie et al., 1987).

Tableau 1: Facteurs analogues à l'interleukine-6

Facteurs s'étant révélés être de l'IL-6
B cell stimulatory factor (BSF-2)
B cell differentiation factor (BCDF)
Interferon β 2 (IFN- β 2)
26 kDa protein
Hybridoma/plasmacytoma growth factor (HPGF)
Interleukin hybridoma plasmacytoma 1 (ILHP-1)
Plasmacytoma growth factor (PCT-GF)
Hepatocyte stimulating factor (HSF)
Macrophage granulocyte inducing factor 2 (MGI-2)
Cytotoxic T cell differentiation factor (CDF)

Ainsi n'aura-t'il fallu qu'un peu moins de dix ans pour caractériser ce polypeptide aux propriétés multiples.

2.1.2. Structure

L'interleukine-6 est un petit polypeptide de 184 Acides Aminés (AA), dont la masse moléculaire varie selon son profil de glycosylation. En effet, on retrouve de nombreux sites de O- et N-glycosylation qui sont différemment glycosylés selon le type cellulaire ou l'espèce à laquelle on s'adresse. De même, certains des résidus sérine de la molécule peuvent être phosphorylés. Les modifications post-traductionnelles ne semblent pas intervenir directement dans l'activité puisque la protéine recombinante préparée dans un système d'expression procaryote conserve toute son activité. La séquence protéique montre 4 résidus cystéine conservés entre les différentes espèces animales. Par comparaison des protéines d'origine murine et humaine, on trouve une homologie de 42%. Une région au centre de la protéine montre une homologie légèrement supérieure (54%). Ainsi, du fait de cette homologie, l'IL-6 d'origine humaine est active sur les cellules de rongeurs mais l'inverse n'est pas vérifié. Cette observation est valable pour la plupart des cytokines. Les séquences nucléotidiques sont quant-à elles homologues à 65%, avec des zones d'homologie plus importantes aux extrémités 3' et 5' non codantes.

2.1.3. Production d'Interleukine-6

L'IL-6 est sécrétée, en condition basale ou après stimulation, par de très nombreuses cellules. Le Tableau 2 dresse une liste non exhaustive des différentes cellules qui produisent de l'IL-6.

La grande variété de cellules capables de sécréter l'IL-6 est à mettre en parallèle avec la quantité relative produite par chacune d'entre elles. Ainsi, un monocyte ou un fibroblaste stimulé par de l'interleukine-1 ou du LPS produira en abondance de l'IL-6 alors qu'un lymphocyte T stimulé par des mitogènes en produira une quantité beaucoup moindre. La répartition des cellules productrices dans tout l'organisme souligne l'importance de cette cytokine dans les mécanismes de défense et met en évidence une action de type non seulement systémique mais aussi locale.

Tableau 2: Cellules ayant la propriété de synthétiser de l'interleukine-6

Cellules normales	Lignées cellulaires	Cellules tumorales
Cellules T	lignées T transformées par HTLV	cellules de myxome cardiaque
Cellules B	U937 Cellule monocytaire	cellules de myélome
Monocytes	P388D1 Cellule monocytaire	cellules de néphrome
Fibroblastes	MG63 lignée ostéosarcome	
Kératinocytes	T24 lignée de carcinome vésicale	
Cellules vasculaires lisses	A549 lignée de carcinome pulmonaire	
Cellules endothéliales	SK-MG-4 lignée de glioblastome	
Astrocytes	U373 lignée astrocytaire	
Myocytes		
Cellules stromales de moelle		
Ostéoblastes		
hépatocytes		
Cellules de Küpffer		
Cellules endométriales		
Cellules épithéliales intestinales		
Cellules mésangiales		
Cellules β pancréas		
Mastocytes		
Neutrophiles		

(Adapté de (Kishimoto, 1989))

2.1.4. Régulation de la production de l'IL-6

De très nombreux agents ont été trouvés inducteurs de la production d'IL-6 et pour ne citer que les plus importants et impliqués en physiologie, on retiendra l'IL-1, le LPS et le TNF, mais d'autres inducteurs tels que le PDGF, certains virus ou Ag, des fragments du complément et des agents physiques peuvent avoir une grande influence pour certains types cellulaires. L'induction de la synthèse d'IL-6 met en oeuvre au moins deux voies: la protéine kinase C et l'adénylate cyclase. Cependant, d'autres voies non encore définies interviennent probablement car, en inhibant ces deux systèmes, une synthèse résiduelle persiste. Le mécanisme de régulation au niveau moléculaire a été étudié par de nombreuses équipes qui ont mis en évidence une zone régulatrice recouvrant environ 300 pb en amont du gène codant pour l'IL-6 et hautement conservée entre les espèces. De nombreuses séquences consensus ont été retrouvées dans cette région en particulier des régions homologues à SRE (c-fos Serum Responsive Element), CRE (cAMP Responsive Element), AP-1 (Activator Protein-1) et GRE (Glucocorticoid Responsive Element). La présence de ces éléments rappelle ce qui est décrit pour les gènes c-fos, gènes pouvant être régulés de manière très rapide et sans synthèse préalable de protéine. La diversité des différents éléments de régulation traduit, elle aussi, les nombreux activateurs potentiels utilisés en expérimentation. Ainsi, trouve-t-on les activateurs de la protéine kinase c (PKc), les ionophores du calcium, les agonistes de l'AMPc, et d'autres composés divers précédemment cités (poly(I).poly(C), cycloheximide, sérum...).

2.1.5. Activités biologiques de l'interleukine-6

Comme nous venons de le décrire, la découverte de l'IL-6 a fait appel à divers domaines de la biologie et cela reflète fidèlement les innombrables effets produits par cette cytokine (Kishimoto, 1992; Klein et al., 1995; Van Snick, 1990).

D'une manière générale, on peut décrire l'IL-6 comme une cytokine aux propriétés impliquées dans pratiquement tous types d'agressions. Ses activités comprennent, la différenciation terminale des lymphocytes B en cellules productrices d'Ig, la stimulation de la croissance de différentes cellules issues de la lignée B (myélome, plasmacytome, hybridome), co-stimulation, avec d'autres cytokines, de la différenciation de colonies hématopoïétiques de

cellules souches, stimulation de la réponse hépatique de la phase aiguë, différenciation et/ou activation des cellules T et des macrophages, implication dans la régulation de certaines hormones et enfin la différenciation neuronale. Cette énumération est loin d'être exhaustive et ne mentionne que les effets les plus marquants de l'IL-6 (Hirano et al., 1990; Jones, 1994; Kishimoto, 1989; Sehgal, 1990; Wolvekamp and Marquet, 1990).

Au delà de ces activités qualifiées de "normales", car impliquées directement dans les processus de défense, on retrouve une sécrétion anormale d'IL-6 dans un certain nombre de pathologies. On peut succinctement mentionner, les états inflammatoires aigus et pathologiques (rejet de transplant, brûlures, syndrome infectieux), la polyarthrite rhumatoïde, les glomérulonéphrites prolifératives, le psoriasis, la maladie de Castleman, le lupus, la maladie de Crohn, les myélomes multiples, certaines leucémies, les carcinomes rénaux et le myxome cardiaque (Akira et al., 1993; Hirano, 1992; Klein et al., 1995; Le and Vilcek, 1989).

Dans le cadre des études des fonctions de l'IL-6, il faut mentionner les travaux réalisés au moyen de souris transgéniques ou "knock-out" pour le gène codant pour cette cytokine. La première étude de Suematsu sur des souris transgéniques montre l'apparition d'une plasmocytose avec infiltration de nombreux organes et une glomérulonéphrite d'un type identique à celle se développant chez certains malades dont la synthèse d'IL-6 est dérégulée (Suematsu et al., 1989). D'autres travaux aux optiques similaires mais aux approches expérimentales différentes (injection d'IL-6 exogène) aboutirent à des conclusions similaires avec l'observation du développement de pathologies diverses (Brandt et al., 1990; Puri and Leland, 1992). Par opposition, chez les souris dont le gène IL-6 a été délété, de nombreuses anomalies apparaissent. Celles ci touchent plus particulièrement la réponse cytotoxique des lymphocytes T, la production d'IgG de type 1, 2a et 2b par les lymphocytes B, certaines activités des macrophages et des granulocytes, la réponse de la phase aiguë dans le cas de certains challenges (en particulier la térébenthine) et enfin le développement des cellules souches (Kopf et al., 1994; Kopf et al., 1995; Romani et al., 1996).

Ainsi, l'interleukine-6 est douée de nombreuses propriétés, nous nous attarderons maintenant sur une étape préalable indispensable à ses activités: l'interaction avec son récepteur.

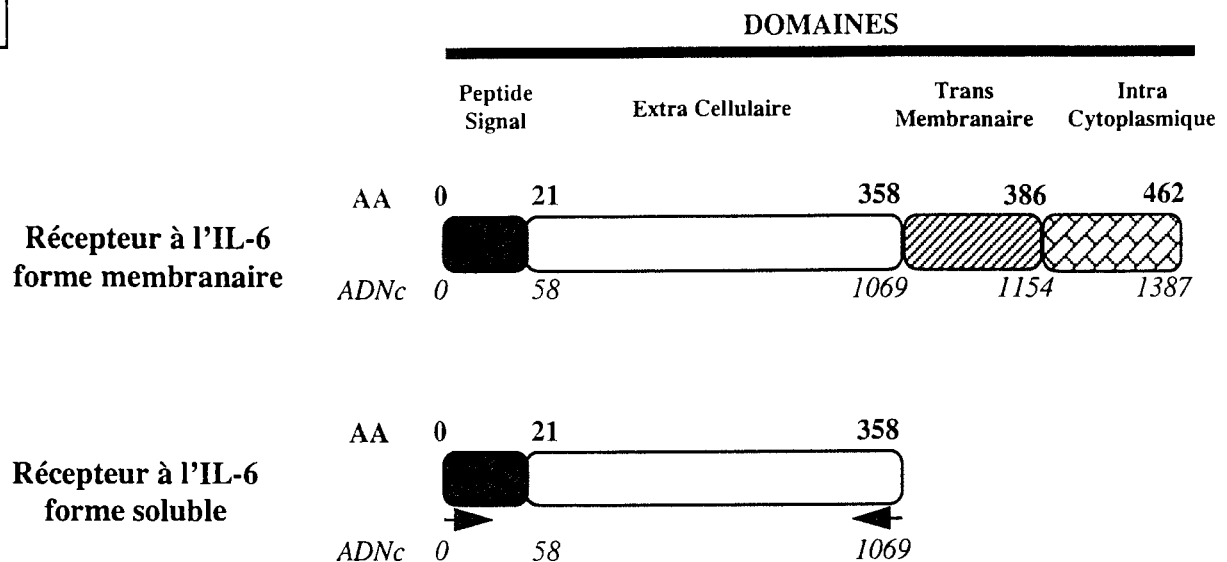
2.2. Le récepteur à l'interleukine 6

2.2.1. Généralités

2.2.1.1. Clonage

Le récepteur à l'interleukine-6 a été cloné en 1988 par Yamasaki et son équipe par une technique qui a depuis démontré son efficacité (Yamasaki et al., 1988). Ces chercheurs ont criblé une banque d'ADNc provenant de cellules "NK-like" qui liaient l'IL-6. En utilisant des cellules COS 7 transfectées avec un ADNc unique provenant de cette banque, ils ont testé leur capacité à lier de l'IL-6 biotinylée. En isolant les clones liant spécifiquement l'IL-6, ils isolèrent un ADNc d'environ 5 kb dont la partie codante correspondait à une séquence protéique de 467 AA et dont la masse moléculaire avoisinait les 80 kDa (Cf. figure 1A). Ce récepteur spécifique ou gp80 (encore appelé chaîne α) consiste en une partie extramembranaire de 339 AA, une partie transmembranaire de 28 AA et une partie intracellulaire, relativement courte, de 82 AA. Une des principales caractéristiques de cette glycoprotéine est de ne pas posséder de domaine tyrosine kinase intracellulaire contrairement à la plupart des récepteurs aux autres cytokines ou hormonaux décrits jusqu'alors. En 1990, Sugita et Coll. clone le récepteur murin (Sugita et al., 1990). Cette même année l'équipe de Baumann rapporte le clonage de l'homologue du récepteur de l'IL-6 chez le rat (Baumann et al., 1990). L'ADNc a été obtenu par criblage des ADNc, provenant d'un foie de rat chez lequel ils avaient induit une réponse de la phase aiguë, au moyen d'une sonde oligonucléotidique correspondant à la séquence humaine. En analysant les ARNm grâce au clone obtenu, les auteurs notèrent la présence de deux ARNm d'environ 5100 pb qui différaient par la longueur de leur région 3' non codante (3' UTR). L'espèce la plus abondante est celle ayant la 3' UTR la plus longue.

A



B

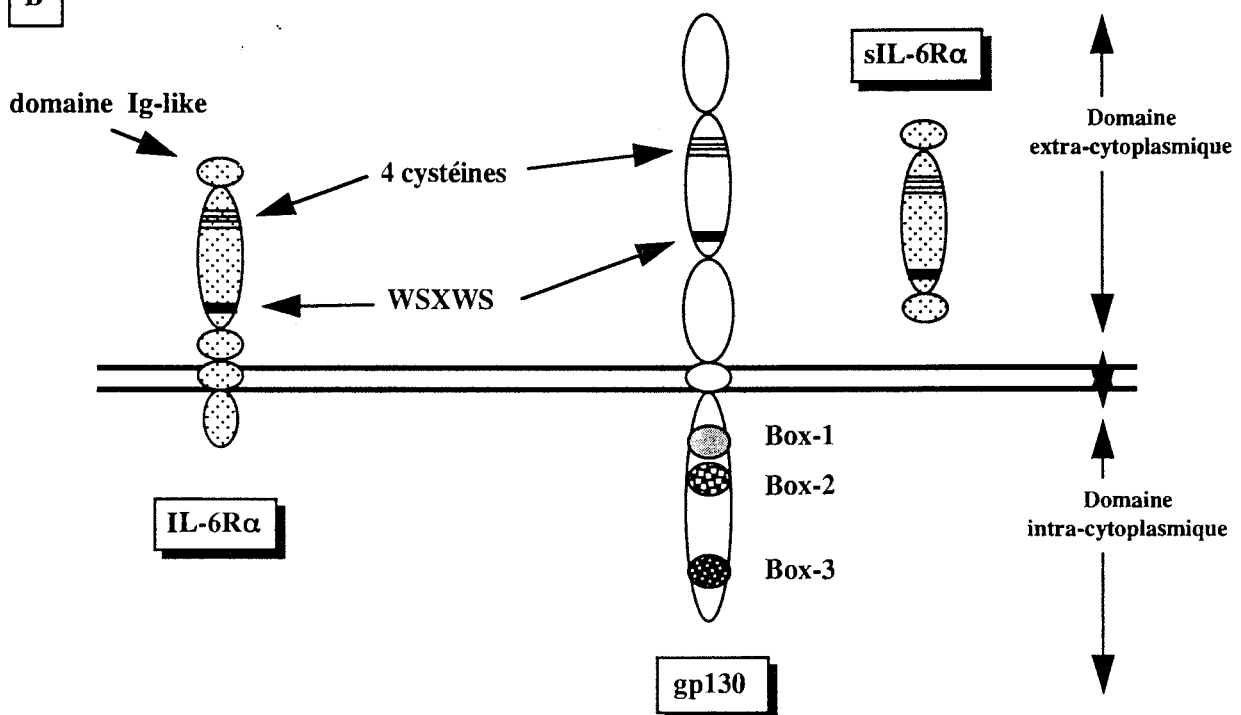


Figure 1: Le récepteur à l'IL-6

A. Représentation schématique des séquences nucléotidiques et protéiques correspondant aux récepteurs membranaire et soluble de l'interleukine-6 du rat. Les deux flèches, placées sous le schéma de la forme soluble, indiquent la position des oligonucléotides utilisés pour générer par PCR la forme soluble du récepteur.

B. Description schématique de la conformation et des caractéristiques essentielles du récepteur à l'IL-6. A gauche se trouve le récepteur membranaire de l'IL-6, gp80 ou chaîne α , à droite la forme soluble, gp54 ou sIL-6R et au centre la gp130 ou chaîne β . Les trois "box" représentent les séquences consensus impliquées dans la transduction du signal et retrouvées dans la séquences d'autres protéines transductrices.

2.2.1.2. Structure

Les séquences nucléotidiques humaine et de rat sont homologues à 71%, et, au niveau protéique, on retrouve des séquences très analogues en particulier dans les parties transmembranaire et intracytoplasmique, l'homologie globale est de 53%. Trois domaines peuvent être qualifiés de remarquables dans ces protéines. Le premier se situe en position N terminale et correspond à une structure C2 de la "superfamille" des immunoglobulines, le deuxième, incluant 4 cystéines conservées entre les espèces, et le troisième, possèdent une importante homologie avec d'autres récepteurs de cytokines ou de facteurs de croissance. On notera en particulier pour ce dernier domaine proche de la membrane, un motif WSXWS qui joue un rôle important dans l'interaction du ligand et de son récepteur, sans doute pour une question de conformation tridimensionnelle du récepteur (cf. figure 1B) (Hilton et al., 1996). La présence de ces deux derniers motifs (4 cystéines conservées et la séquence WSXWS) définit la famille des récepteurs aux cytokines dont les membres sont les récepteurs pour l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-11, l'IL-12, l'EPO, le G-CSF, le GM-CSF, le LIF et la CT-1. La succession de ces séquences induit une conformation du récepteur à l'IL-6 équivalente à deux modules de fibronectine de type III, d'environ 100 AA, reliés par un coude (incluant le motif WSXWS) ce qui forme une sorte de poche permettant d'accueillir le ligand (cf. figure 2) (Bazan, 1990).

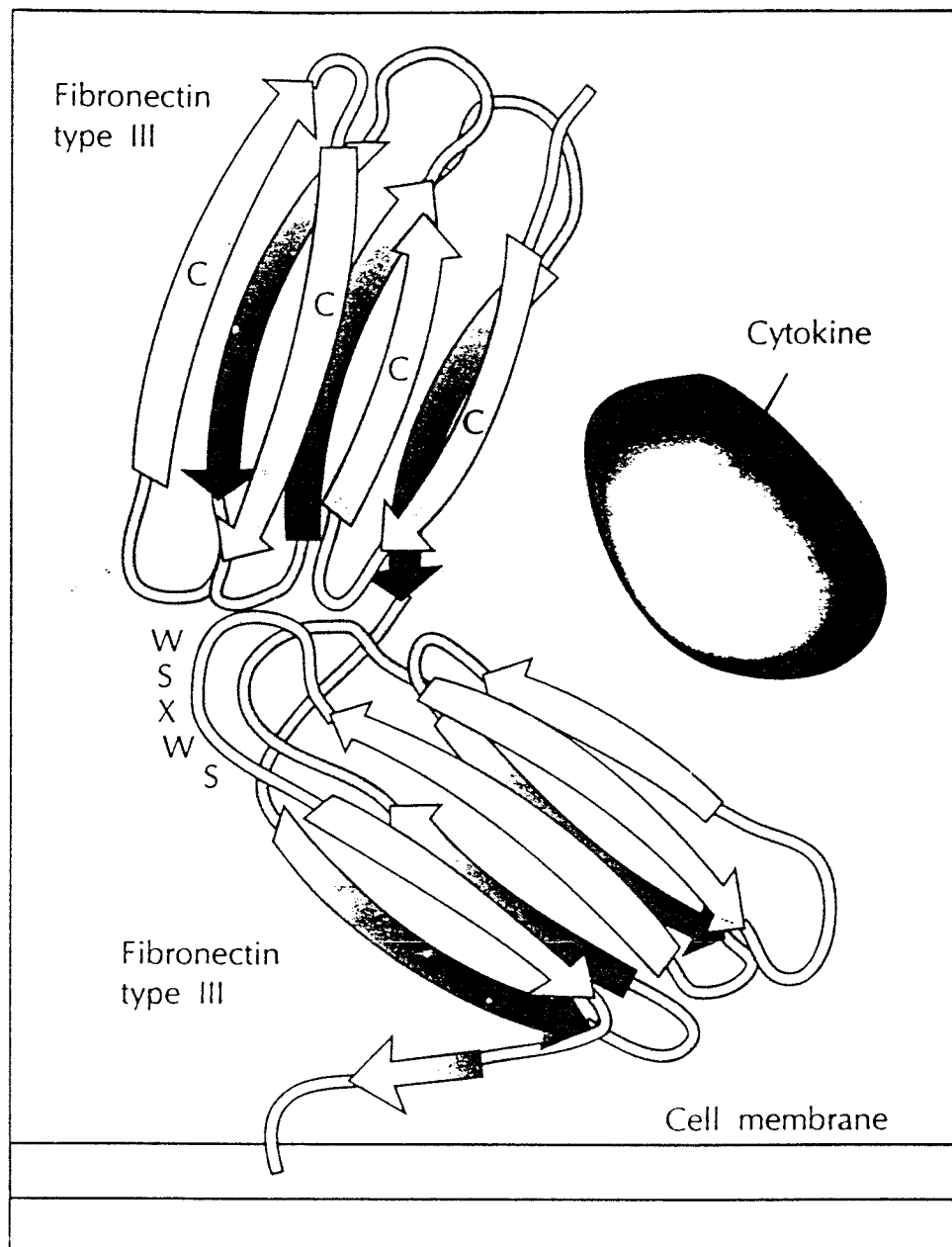


Figure 2: Structure tertiaire du récepteur à l'IL-6 (d'après (Akira and Kishimoto, 1992))

Modèle de la structure tertiaire du récepteur à l'IL-6. Une sorte de poche, formée par deux repliements du type "fibronectine de type III" séparés par la séquence WSXWS, permet de recevoir le ligand. Chaque domaine "fibronectine" est composé d'environ 100 AA repliés selon une structure de feuillet β . (C, cystéine)

2.2.1.3. Distribution

Le récepteur à l'IL-6 est présent sur de très nombreuses cellules dans l'organisme qu'il ne serait pas possible de mentionner ici. Tout au plus pouvons nous citer plus particulièrement les hépatocytes, les cellules T et B activées, les cellules spléniques et certaines cellules de la moelle osseuse. La densité des récepteurs à la surface des cellules varie de 10 à 500 en règle générale, et certaines lignées cellulaires peuvent exprimer jusqu'à plus de 20 000 d'entre eux (Bauer, 1989; Coulie et al., 1989; Hirano et al., 1989; Rose-John et al., 1990).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la partie intracellulaire courte du récepteur ne possède pas de structure compatible avec une activité protéine kinasique ou phosphatasique, il fallait donc trouver une explication quant à l'activité de l'IL-6 et les mécanismes mis en jeu pour générer un effet. C'est l'équipe de Taga au Japon qui élaborait une réponse à ce problème en démontrant, d'une part que la partie intracellulaire du récepteur n'était pas utile à la transmission du signal, et d'autre part que le récepteur était associé à un autre composant de 130 kDa (Taga et al., 1989). Un an plus tard Hibi et coll. clonaient la protéine transductrice du signal de l'IL-6 ou gp130 (Hibi et al., 1990).

2.2.2. La gp130, protéine transductrice

Suite à son clonage et grâce à des anticorps spécifiques, Hibi et coll. réussirent à démontrer que la gp130 transformait la gp80, récepteur de faible affinité pour l'IL-6, en récepteur de haute affinité par interaction directe (Hibi et al., 1990). Cette protéine transductrice est retrouvée de manière ubiquitaire sur pratiquement toutes les cellules de l'organisme. De poids moléculaire 130k Da, il s'agit d'une glycoprotéine de 918 AA comportant un seul domaine transmembranaire et une partie extracellulaire comprenant six unités de fibronectine de type III (le motif retrouvé dans le récepteur à l'IL-6, gp80). On retrouve aussi dans la partie N-terminale le motif commun aux récepteurs des cytokines (4 cystéines et la succession WSXWS). La partie intracellulaire de 277 AA possède de nombreuses homologues avec d'autres protéines transductrices telles l'IL-2R β , le G-CSFR β et

l'IL-12R β , et on peut définir des séquences consensus pratiquement toujours retrouvées dans la famille des récepteurs aux cytokines hématopoïétiques (Murakami et al., 1991). Ces régions de grande homologie ont été regroupées sous le terme de "box" 1, 2 et 3, chacune d'entre elles semble posséder une fonction bien précise dans la genèse des signaux intracellulaires (cf. figure 1B). Pour ne citer qu'un exemple, au sein de la "box 1" on trouve une séquence riche en prolines importante pour l'interaction avec les protéines de signal intracellulaire. Cette notion sera développée dans les paragraphes suivants. Deux années plus tard Wang et coll. clonèrent la gp130 du rat et Saito et coll. celle de la souris, ces deux équipes décrivent une homologie de l'ordre de 78% avec la forme humaine (Saito et al., 1992; Wang et al., 1992).

2.2.3. Une protéine transductrice et un récepteur spécifique: un nouveau concept

Le concept de chaîne α associée à une seconde chaîne (chaîne β) responsable de la transduction du signal a ouvert la voie à la caractérisation de nombreux autres récepteurs de cytokines tels que l'IL-3R, l'IL-5R, le GM-CSFR qui partagent une chaîne β commune ou l'IL-2R, l'IL-4R, l'IL-7R, l'IL-9R et l'IL-15R qui ont en commun une ou plusieurs chaînes (Budel et al., 1995; Horseman and Yu-Lee, 1994; Taga and Kishimoto, 1992; Taga and Kishimoto, 1990). Dans le cas de la gp130 une revue de la littérature nous montre son implication comme protéine transductrice unique dans le système IL-6 et IL-11, et en association avec le LIFR β pour le LIF, l'OM, la CT-1 et le CNTF (cf. figure 3) (Davis et al., 1993; Gearing et al., 1992; Hilton et al., 1994; Murakami et al., 1993; Pennica et al., 1995; Taga et al., 1992). Pour l'IL-12, l'implication de la gp130 fut suspectée mais il s'agit en fait d'une protéine homologue mais différente de la gp130 (Chua et al., 1994).

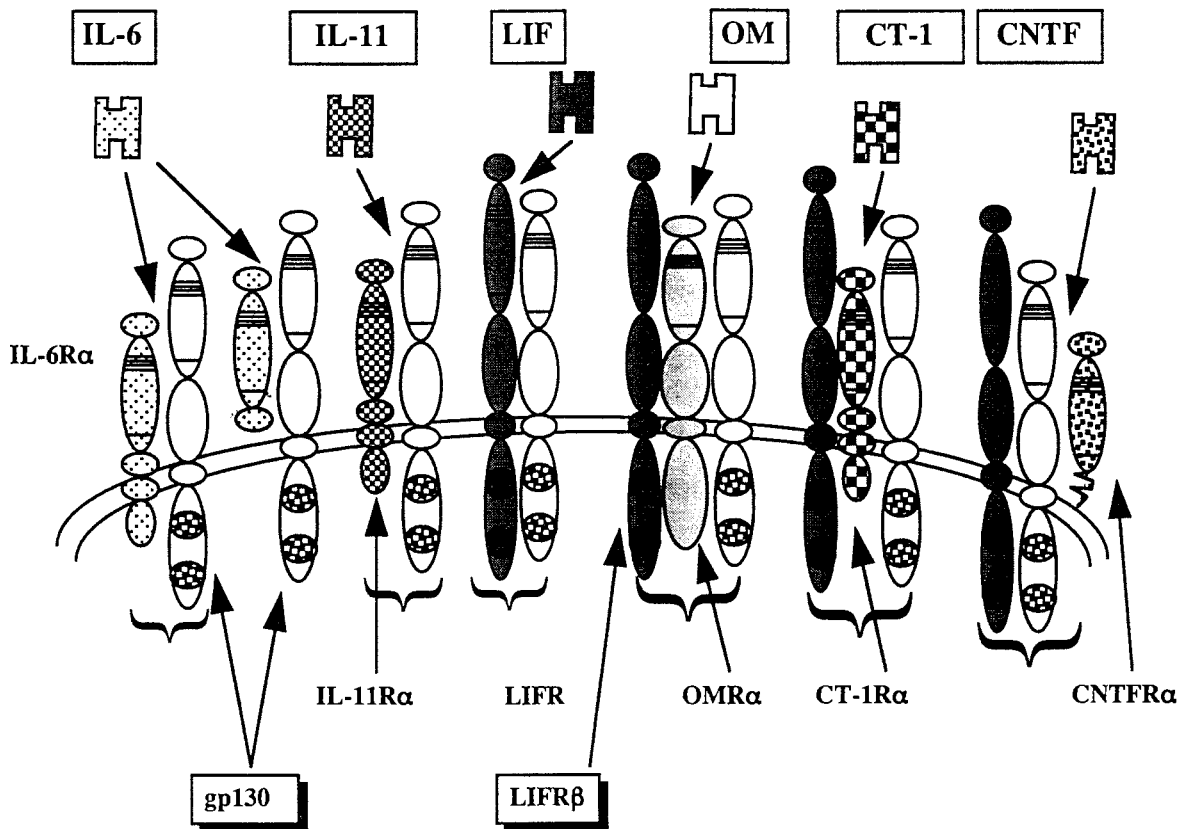


Figure 3: Les cytokines "IL-6 like" et leurs récepteurs

Représentation schématique de la famille des récepteurs aux cytokines hématopoïétiques "IL - 6 like". Tous ces récepteurs possèdent une chaîne α ayant la propriété de lier de façon spécifique un ligand et une ou deux chaînes β , responsable de la transduction du signal. La chaîne β , gp130, intervient seule comme protéine transductrice dans le cas des récepteurs à l'IL-6 et à l'IL-11 et en association avec le LIFR β (ou gp190) pour le LIF, le CNTF, l'OM et la CT-1. Les chaînes α du récepteur à l'OM et de la CT-1 n'ont été que partiellement caractérisées.

2.2.4. Mécanismes d'interaction de l'IL-6 et de son récepteur

Afin de déclencher un quelconque effet sur une cellule, l'IL-6 doit passer par une succession d'étapes bien définies. Tout d'abord l'IL-6 doit interagir avec son récepteur sous forme membranaire ou soluble (cette dernière sera décrite ultérieurement). Il s'agit d'une interaction de faible affinité ($K_d = 5,3 \text{ nM}$) et ne mettant en jeu uniquement que la chaîne α du récepteur et son ligand. Un complexe actif IL-6/IL-6R soluble peut d'ailleurs être retrouvé dans la circulation. Ensuite, au niveau de la surface cellulaire, il se produit une interaction du complexe précédemment cité avec la chaîne β ou gp130. En transfectant la gp130 dans des cellules ne possédant uniquement que la chaîne α , l'affinité de l'IL-6 pour son récepteur augmente considérablement. Une mesure de l'interaction IL-6/IL-6R/gp130 par analyse de Scatchard montre une affinité de l'ordre de 40 pM environ après transfection, soit une augmentation d'affinité d'environ 100 fois par rapport à celle de l'IL-6 pour la gp80 isolée. La gp130 interviendrait donc comme un stabilisateur de la gp80 pour son ligand.

Des études récentes montrent que l'on retrouve en fait une structure hexamérique mettant en jeu deux molécules de chaque protagoniste (IL-6, chaînes α et β) (Paonessa et al., 1995; Ward et al., 1994; Ward et al., 1995). La formation d'hexamères dans les interactions cytokine/récepteur se retrouve d'ailleurs pour d'autres ligands tel le CNTF (De Serio et al., 1995). Chaque étape de ces interactions implique des zones bien particulières de chacun des composants. Des expériences par mutagenèse ou création de protéines chimériques ont défini la partie charnière, WSXWS, (entre les deux repliements en forme de barils) de la gp80 importante pour son interaction avec l'IL-6 et la partie proche de la membrane (le fond du premier baril) impliquée dans son interaction avec la gp130 (cf. figure 2) (Yawata et al., 1993). Des expériences similaires ont permis de définir les régions critiques de l'IL-6 et de la gp130 (Brakenhoff et al., 1994; de Hon et al., 1994; Ehlers et al., 1995; Ehlers et al., 1994; Fontaine et al., 1991; Fontaine et al., 1993; Leebeek and Fowlkes, 1992; Leebeek et al., 1992; van Dam et al., 1993). Ces études ont par ailleurs été confirmées grâce à des anticorps monoclonaux se liant à des épitopes particuliers de chacune de ces protéines et limitant par compétition spécifique les étapes d'interaction entre chaque composant (Dehon et al., 1995; Fontaine et al., 1993; Shimamura et al., 1991; Wijdenes et al., 1991; Wijdenes et al., 1995).

2.2.5. Genèse d'un signal cytoplasmique

Le résultat final de l'interaction IL-6/IL-6R/gp130 est l'homo-dimérisation de la protéine transductrice du signal, gp130 (Murakami et al., 1993). Comme nous l'avons mentionné précédemment, ni l'IL-6R ni la gp130 ne sont doués d'activité kinasique ou phosphatasique, il fallu alors envisager un nouveau système de transduction du signal qui ne passait pas par les systèmes qualifiés de conventionnels. Il fut tout d'abord démontré que l'interaction de l'IL-6 et de son récepteur, gp80 et gp130, à la surface cellulaire induisait une phosphorylation des résidus tyrosines intracellulaires de la gp130 (Hibi et al., 1990; Murakami et al., 1991; Taga et al., 1989; Taga et al., 1989; Taga et al., 1992). Cette phosphorylation était associée, pour d'autres systèmes présentant des analogies avec l'IL-6 et son récepteur (tel l'EPO ou la GH), à la formation d'hétérodimères (Bazan, 1991). Ainsi, l'équipe de Murakami eut l'idée d'étudier la formation de dimères dans des cellules transfectées par un vecteur exprimant soit la gp130, soit un mutant de la gp130 dans lequel deux tyrosines avaient été supprimées et remplacées par des prolines (Murakami et al., 1993). Ils constatèrent que l'interaction d'un complexe IL-6/sIL-6R avec la gp130 induisait non seulement une dimérisation de la gp130 mais aussi une phosphorylation de ses résidus tyrosines. Leurs expériences prouvèrent que l'homodimérisation était indispensable mais non suffisante à la transduction du signal; la phosphorylation de la gp130 devait aussi intervenir. Cette même année, Davis et ses collaborateurs démontrèrent un phénomène analogue pour le LIF et le CNTF, où une hétéro-dimérisation des protéines transductrices LIFR β et gp130 précède leur phosphorylation (Davis et al., 1993).

Ainsi peut-on tirer la conclusion générale que les récepteurs des cytokines appartenant à la famille des cytokines hématopoïétiques nécessitent, pour transmettre leur message, une protéine annexe dont l'étape d'activation comporte une dimérisation puis une phosphorylation. Ce procédé est retrouvé aussi pour l'érythropoïétine, l'EGF, le PDGF, et le CSF-1 (Heldin, 1995).

2.2.6. Signaux intracellulaires induits par l'IL-6

2.2.6.1. Les "JAK"

Depuis la caractérisation de la gp130, de nombreux travaux ont démontré la présence d'une activité tyrosine kinase et la présence de protéines phosphorylées cytoplasmiques après activation du récepteur de l'IL-6 et en particulier après la phosphorylation de la gp130 (phosphorylation n'intervenant qu'après dimérisation de gp130). Par opposition, il n'y a pratiquement jamais de changement biochimique intracellulaire tels que l'augmentation de la concentration du Ca intracellulaire, ou modification des phosphatidyls inositols. Dès 1993, l'équipe de Ihle démontrait l'association du récepteur de l'EPO avec une protéine kinase de type JAK et la conséquente phosphorylation de l'EPO-R (Witthuhn et al., 1993). C'est finalement en 1994 que Lütticken et coll. décrivent un phénomène similaire pour le système de l'IL-6 (Lütticken et al., 1994; Stahl et al., 1994). La famille des protéines kinases JAK (pour "Just Another Kinase" ou "Janus Kinase") comprend 4 membres (Jak1, 2, 3, et Tyk 2) qui sont des protéines de 120 à 140 kDa. Leurs principales caractéristiques sont l'absence de domaine de type src homologue (SH2 ou SH3) et la présence de deux domaines de type kinase dont seulement l'un d'entre eux est fonctionnel. Certaines de ces protéines ont été retrouvées associées à la chaîne gp130 de l'IL-6R, il s'agit de Jak 1 et 2 et de Tyk2 (Narazaki et al., 1994; Stahl et al., 1994). En fait, selon les cellules que l'on étudie, on peut trouver des Jak différentes associées à la protéine transductrice du signal (Guschin et al., 1995). L'une des hypothèses la plus plausible pour l'activation des protéines Jak est la suivante: lors de la formation d'un dimère de la protéine transductrice il y a formation d'un dimère de Jak (hétéro- ou homo-dimère) ce qui induit une auto-activation, résultant en une activité kinasique. Il faut ici souligner l'importance de la partie proximale membranaire de la gp130. En effet, par des expériences de transfection de molécules gp130 partiellement délétées dans leurs parties C-terminales, il a été mis en évidence l'importance de 2 régions hautement conservées et communément dénommées "box 1" et "box 2" (Murakami et al., 1991). Il s'agit de portions d'environ 60 acides aminés retrouvées dans les différents systèmes de récepteurs aux cytokines. Un motif de "box 1", Pro-X-Pro, semble particulièrement impliqué dans l'interaction Jak/gp130 et la mutation d'un des résidus entraîne la perte de la transduction du

signal (Tanner et al., 1995). Plus récemment, une troisième région "box 3" a été caractérisée et impliquée dans la synthèse des protéines de la phase aiguë induite par l'IL-6 (Baumann et al., 1994; Baumann et al., 1994). Les protéines JAK seraient pré-associées à la gp130 par des interactions au niveau de ces séquences consensus conservées et entreraient en contact lors de la dimérisation (cf. figure 4A).

2.2.6.2. Les "STAT"

L'étape de la signalisation au niveau du récepteur ayant été décrite, il nous faut maintenant nous pencher sur les molécules impliquées dans le transport du signal de la membrane cellulaire vers le noyau. Une nouvelle famille de facteurs de transcription a été décrite pour cette fonction. Il s'agit des protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) qui ont été particulièrement étudiées dans les voies d'activation de l'IFN α/β (Feldman et al., 1994). Ce sont des protéines de masse moléculaire d'environ 100 kDa et dont les particularités résident dans la présence d'une tyrosine unique aux environs du résidu 700, de la capacité de lier, lorsqu'elles sont phosphorylées et par conséquent dimérisées, une séquence d'ADN spécifique, enfin, de posséder un domaine SH2 (Stahl et al., 1995). Jusqu'à présent, cette famille de protéines compte 6 membres dénommés STAT-1 à STAT-6. Chacun d'entre eux a montré intervenir dans la transduction du signal de différentes cytokines. Ainsi, l'IFN α fait intervenir STAT 1, 2 et 3 alors que l'IFN γ induit uniquement l'activation de STAT 1. Dans le cadre de l'IL-6, STAT 1 et 3 ont été directement impliqués (Matsuda and Hirano, 1994; Matsuda et al., 1994; Wegenka et al., 1994; Zhong et al., 1994). Le schéma proposé pour l'activation gp130/Jak/STAT serait le suivant: après homo-dimérisation de gp130, il y a activation de Jak1 (Jak2 ou Tyk2) par interaction de deux Jak qui vont phosphoryler les résidus tyrosine de gp130 selon un profil bien déterminé, puis il y a recrutement, par leur domaine SH2, de protéines STAT (1 ou 3) qui sont phosphorylées sur leur tyrosine; elles pourront alors interagir deux à deux et transloquer vers le noyau où elles se fixeront sur des séquences spécifiques d'ADN (cf. figure 4B) (Stahl et al., 1995). Très récemment une équipe allemande a décrit un nouveau motif spécifique de la gp130 impliqué dans le recrutement spécifique de STAT 1 (Gerhartz et al., 1996). La phosphorylation des STAT est importante

pour la fixation spécifique du dimère sur l'ADN mais aussi pour sa migration vers le noyau, cette dernière étape n'est cependant pas encore élucidée.

2.2.6.3. Les autres voies de signalisation

Cette description du signal induit par l'IL-6 n'est en fait qu'une façade d'un système probablement beaucoup plus complexe. Au delà de Jak et STAT de nombreux autres molécules interviennent, il faudrait citer entre autres les phosphatases qui participent sans doute à la régulation négative de l'activation ainsi que la voie impliquant Ras et les Mitogen Activated Protein ou MAP kinases (cf. figure 5) (Kishimoto et al., 1994).

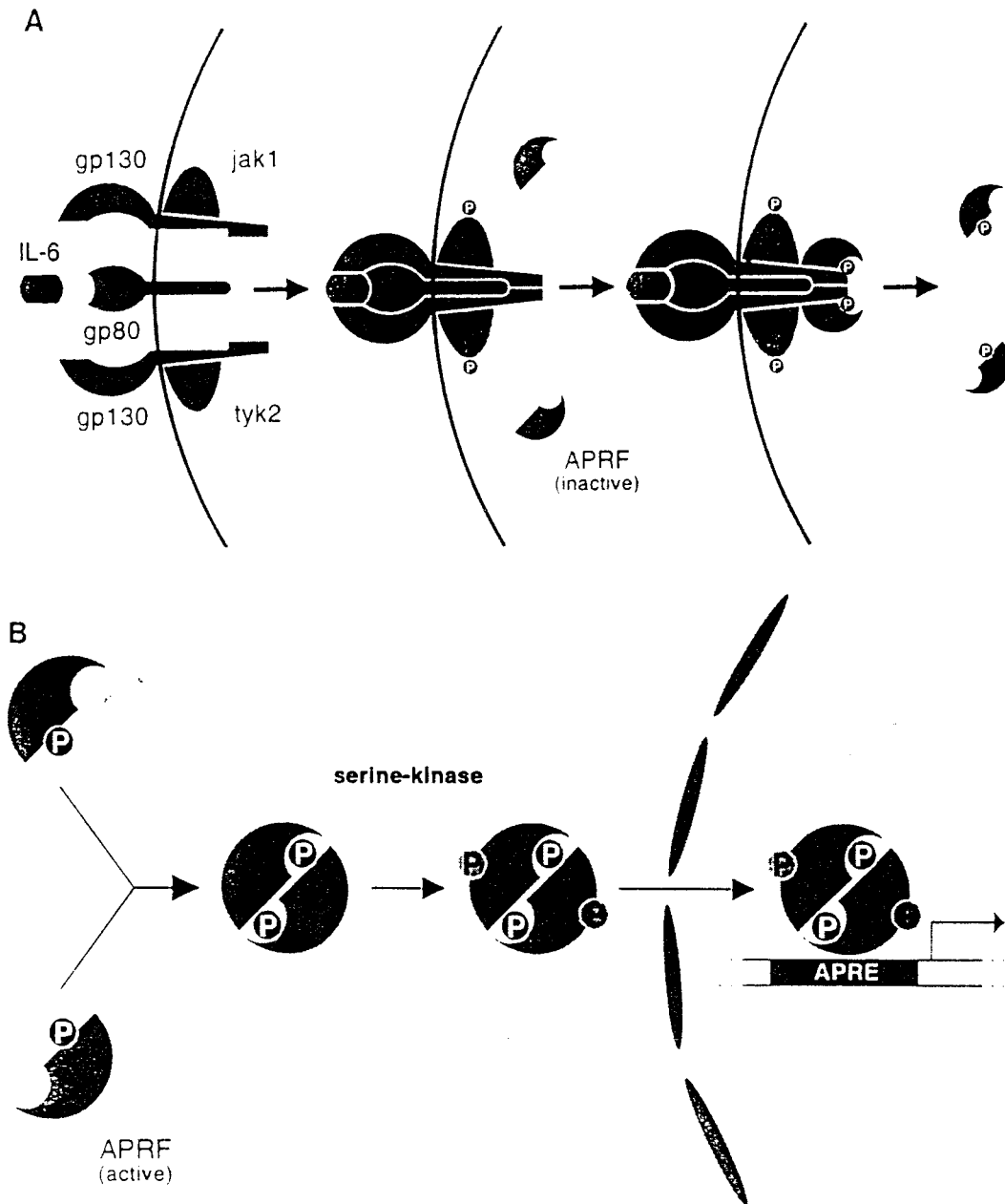


Figure 4: Mécanismes de la transduction du signal par la voie JAK/STAT(d'après (Heinrich et al., 1995)).

A: L'IL-6 se lie à la chaîne gp80, et ce complexe (probablement un complexe de 2 molécules d'IL-6 et de gp80) va induire la formation d'un homodimère de gp130 à la surface cellulaire et par conséquent l'activation des protéines "Jak" (ici, jak 1 et tyk 2) constitutivement liées à la gp130. Celles ci induisent la phosphorylation de la gp130 selon un motif bien précis et par conséquent le recrutement des protéines STAT (ici, APRF), puis leur tyrosine-phosphorylation.

B: La phosphorylation des protéines STAT induit leurs activations et leurs homo- ou hétéro-dimérisations, puis une sérine-phosphorylation intervient dans le compartiment cytoplasmique. Les dimères ainsi formés transloquent dans le noyau et se lient à des séquences spécifiques au sein des promoteurs de gènes cibles de l'IL-6. (APRF, Acute Phase Response Factor; APRE, Acute Phase Responsive Element).

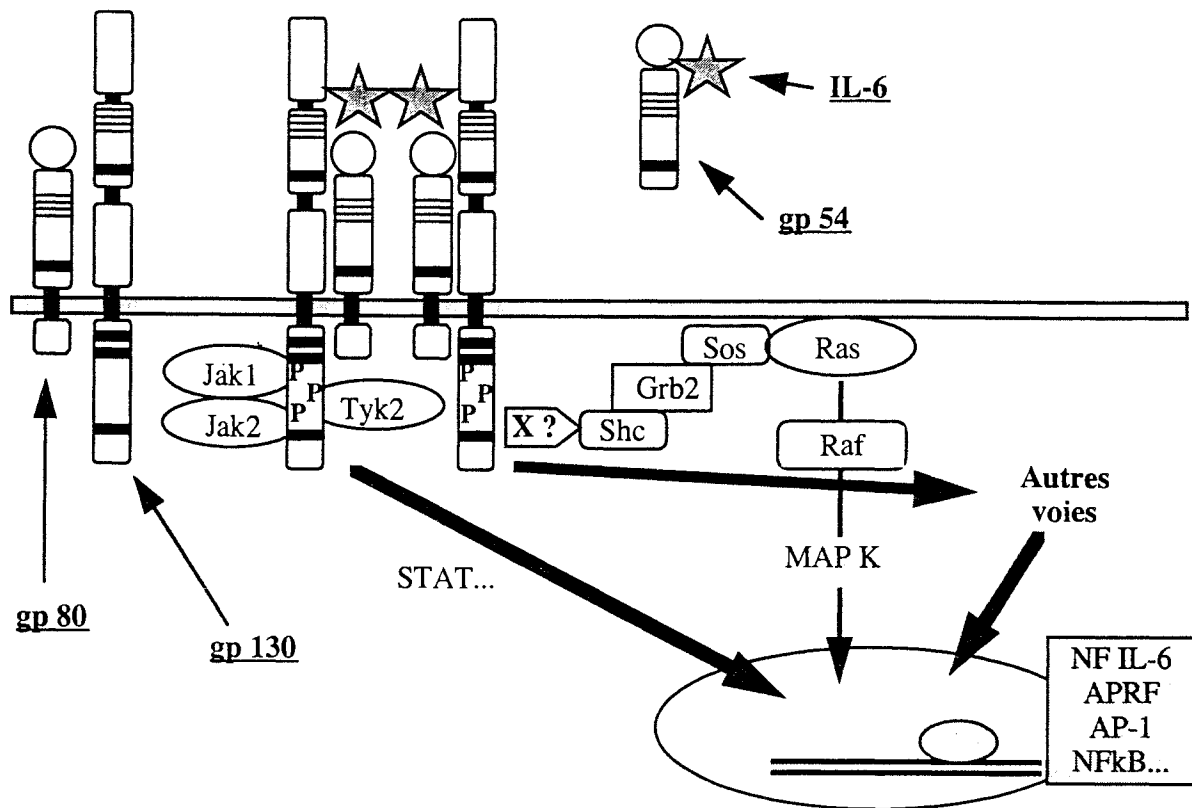


Figure 5: l'IL-6 et la transduction du signal.

Schéma des différentes voies impliquées dans la genèse d'un signal par l'IL-6. Les premières étapes sont similaires à celles décrites dans la figure 4A. L'homodimérisation de gp130 déclenche l'activation des tyrosines kinases "jak" qui phosphorylent les gp130 mais probablement d'autres substrats telles que les protéines impliquées dans la voie d'activation de la protéine "Ras". Cette activation serait suivie de la cascade des "MAPK" (Mitogen Activated Protein Kinase) et induirait l'activation de facteurs de transcription intranucléaires. Une autre voie hypothétique serait mise en jeu mais les protéines impliquées n'ont pas encore été caractérisées.

2.3. Le récepteur soluble à l'interleukine-6.

2.3.1. Historique et mécanisme d'action

Comme nous l'avons décrit précédemment, la partie intracellulaire du récepteur à l'IL-6 ne semble participer à aucune fonction dans la transduction du signal (Fiorillo et al., 1992; Taga et al., 1989). En 1989, après que le récepteur fut cloné, l'équipe de Taga démontra qu'en produisant une protéine correspondant à la partie extracellulaire du IL-6R (ou sIL-6R) et en la faisant agir, en présence d'IL-6, sur des cellules possédant exclusivement la gp130 à leur surface, on pouvait induire un signal intracellulaire. L'explication réside dans le fait que l'IL-6 se lie sur la portion N-terminale du récepteur et ce complexe (IL-6/sIL-6R) peut interagir avec les gp130 membranaires en formant un hexamère (2 molécules d'IL-6, de sIL-6R et de gp130) (Hammacher et al., 1996; Paonessa et al., 1995; Ward et al., 1994). C'est l'équipe de Novick qui décrit la première la présence, dans de l'urine humaine, d'un récepteur soluble ayant la propriété de lier l'IL-6. En partant de 900 litres d'urines cette protéine fut purifiée et analysée par séquençage partiel et électrophorèse. Il s'agit d'une molécule dont la masse moléculaire est d'environ 50-52 kDa et dont la séquence N-terminale est analogue à la séquence extramembranaire du récepteur à l'IL-6 (Novick et al., 1990; Novick et al., 1989). Les progrès de la biologie moléculaire ont permis, dans le même temps, le clonage du récepteur humain et la synthèse de sa partie extramembranaire puis la production d'anticorps poly- ou monoclonaux dirigés contre cette protéine (Hirata et al., 1989; Saito et al., 1991; Yasukawa et al., 1990).

Dès lors, et secondairement à la mise à disposition d'anticorps permettant la détection du récepteur soluble, un grand nombre de travaux furent entrepris sur la mise en évidence de cette protéine dans différents milieux ou liquides biologiques. Nakajima et coll. et Honda et coll. rapportèrent la production de récepteur soluble à l'IL-6 dans le surnageant de culture de cellules monocytaires (RPMI 8226 ou 1788) ou myélo-monocytaires (U937, HL-60 ou THP-1), production par ailleurs augmentée lors de l'infection des cellules U937 par le virus VIH ou traitement par du PMA (Nakajima et al., 1992). Ainsi, un dosage du récepteur circulant chez

des patients infectés par le VIH montre une augmentation des taux sériques par rapport à des témoins normaux (169.6 ± 62 vs. 75.5 ± 42 ng/ml respectivement) (Honda et al., 1992).

2.3.2. Le récepteur soluble à l'IL-6 in vivo, données physiologiques et physiopathologiques

De nombreuses équipes ont étudié les variations physiologiques du sIL-6R. Nous rapporterons ici leurs principales données.

-Une des premières études s'est orientée sur les enfants atteints d'arthrite rhumatoïde juvénile. Chez ces patients, il y a une diminution de la concentration en sIL-6R circulant (114 vs. 161 ng/ml) mais une augmentation des complexes IL-6/sIL-6R circulants et de l'IL-6 (De Benedetti et al., 1994). Ces deux derniers paramètres sont bien corrélés à la concentration sérique de la CRP et peuvent présager un effet régulateur positif du récepteur soluble sur la synthèse des protéines de la phase aiguë.

-Dans les maladies inflammatoires intestinales du type maladie de Crohn, colite ulcéreuse ou colite simple, la situation est inverse et on retrouve une augmentation modérée du sIL-6R et des complexes IL-6/sIL-6R avec une bonne corrélation avec la concentration sérique de CRP (Mitsuyama et al., 1995). Ces premières études sur des maladies inflammatoires semblent indiquer un rôle pathophysiologique à ces complexes.

-Le rapport du sIL-6R avec d'autres pathologies a été étudié en hématologie et, que ce soit dans les pathologies lymphocytaires (Leucémie lymphoïde chronique, gammopathie monoclonale, lymphomes) ou les myélomes multiples, il existe une augmentation du taux de sIL-6R circulant mais celle-ci fait l'objet de controverses quant à son association avec une plus grande sévérité de la maladie (Gaillard et al., 1993; Lavabre-Bertrand et al., 1995; Ohtani et al., 1995; Smith and Morgan, 1996). Une étude très récente de Kyrtsonis et coll. semble confirmer qu'une élévation du récepteur soluble témoignerait d'une mauvaise réponse au traitement des myélomes multiples (Kyrtsonis et al., 1996).

-De même, dans le lupus, il existe des variations de la concentration sérique du sIL-6R qui suivent celles de l'IL-6 (Evans and Abdou, 1994). Les auteurs ébauchent l'hypothèse de la participation du sIL-6R dans cette maladie.

-L'implication du sIL-6R a été aussi évaluée lors de variations physiologiques ou pathologiques des hormones sexuelles, ainsi assiste-t-on à une augmentation du sIL-6R sérique lors de la grossesse (jusqu'à 120 ng/ml au second trimestre pour une normale à 76 ng/ml) et une diminution dans les cas d'endométriose, avec, dans ce dernier cas, une corrélation inverse de la concentration de sIL-6R dans le liquide péritonéal et la sévérité de la maladie (Matsuzaki et al., 1995; Rier et al., 1995). L'IL-6 et son récepteur soluble interviendraient dans le contrôle de la croissance des cellules de l'endomètre.

-Dans les infections sévères, plusieurs études ont montré une diminution significative de la concentration en sIL-6R sérique parallèlement à une augmentation de l'IL-6 sérique (Frieling et al., 1995; Lehrnbecher et al., 1995; Zeni et al., 1995). Yokohama et son équipe ont étudié la variation de la concentration en sIL-6R chez des patients atteints de pathologies pulmonaires interstitielles (pneumonie, sarcoïdose) (Yokoyama et al., 1995). Leurs résultats montrent que dans ces pathologies il y a une élévation significative du sIL-6R dans le sérum, le BAL et le liquide péri-épithélial. Le fait qu'il y ait une corrélation entre le niveau d'albumine et de sIL-6R dans les liquides pulmonaires semble traduire une intravasation du compartiment sanguin vers le compartiment pulmonaire. Ainsi, contrairement aux cas des infections aiguës où l'on retrouve un sIL-6R sérique diminué, lors d'infections moins sévères ou chroniques il y aurait augmentation de celui-ci. Cette étude serait à rapprocher de celle de Mitsumaya, qui, dans des conditions inflammatoires chroniques du système digestif, trouve lui aussi une augmentation modérée de la concentration sérique du sIL-6R (Mitsuyama et al., 1995).

-Enfin, l'étude de Frieling permet de faire une synthèse sur les concentrations normales du sIL-6R dans les différents fluides physiologiques sérum (77 ng/ml), urine (3.7 ng/ml), liquide céphalo-rachidien (1.6 ng/ml) et liquide synovial (11.6 ng/ml) (Frieling et al., 1994). Il faut rapporter à titre anecdotique les travaux de Atsumi et coll. et de Maes et coll. qui ont étudié, respectivement, les concentrations du sIL-6R dans le cas d'une maladie de Crow-Fukase et de dépressions majeures (Atsumi et al., 1995; Maes et al., 1995).

Quelques équipes ont étudié ce même paramètre (sIL-6R) chez la souris. Suzuki et coll. ont travaillé sur une souche MRL/lpr, modèle de souris pour les maladies auto-immunes humaines (Suzuki et al., 1993). La concentration sérique de sIL-6R chez l'animal jeune est

très faible, mais on assiste à une augmentation au fur et à mesure du développement des lésions auto-immunes. Une comparaison faite entre des lignées de souris normales et celles développant une maladie auto-immune spontanée confirme l'ascension du taux de sIL-6R lors des manifestations auto-immunes. Il faut souligner que chez la souris normale le niveau de sIL-6R est beaucoup plus faible que chez l'homme (environ 3 ng/ml vs. 75 ng/ml). Maeda et coll. ont étudié la variation de la concentration sérique de sIL-6R au cours de la gestation chez la souris ICR (Maeda et al., 1994). Contrairement à l'étude précédente, ils retrouvent environ 45 ng/ml avant la fécondation, puis une augmentation graduelle de cette concentration après le 7ème jour de gestation et jusqu'au 17ème jour (150 ng/ml). Ces résultats s'apparentent à l'étude chez l'homme de Matsuzaki (Matsuzaki et al., 1995). Les cellules impliquées dans la synthèse du sIL-6R seraient les cellules déciduales et non les placentaires (Yamaguchi et al., 1995). Le récepteur soluble serait indispensable à l'action de l'IL-6 sur les cellules placentaires et son augmentation au cours de la grossesse correspondrait au recrutement des cellules placentaires pour la synthèse, entre autres, de prolactine.

2.3.3. Le récepteur soluble à l'IL-6 in vitro

De nombreuses équipes ont généré des récepteurs solubles en exprimant la partie extracellulaire du récepteur à l'IL-6 dans différents systèmes d'expression et ont étudié leurs effets sur différents paramètres *in vitro* (Stoyan et al., 1993; Taga et al., 1989; Weiergraber et al., 1995; Yasukawa et al., 1990).

Mackiewicz utilisa du hsIL-6R recombinant (5 U/ml) purifié à partir de surnageant de culture de fibroblastes NIH/3T3 et démontra qu'il augmentait la sensibilité de cellules d'hépatomes humains (HepG2) à l'IL-6 (1 à 1000 U/ml) (Mackiewicz et al., 1992; Mackiewicz et al., 1992). Il développa aussi un système dans lequel des cellules HepG2 étaient transfectées par l'ADNc codant pour l'IL-6 humaine. Ces cellules stimulées en permanence par l'IL-6 deviennent hypo-réactives à l'IL-6 (sans doute par baisse de l'expression de récepteurs membranaires) et du récepteur soluble est nécessaire pour induire une réponse IL-6 dépendante. Il faut noter la difficulté à interpréter les résultats publiés par cette équipe, du fait de l'utilisation d'unités arbitraires pour quantifier le sIL-6R.

Hooper et coll. ont analysé l'effet du sIL-6R sur des cellules HepG2 stimulées par de l'IL-6 (5 ng/ml) et retrouvent une action co-stimulatrice du sIL-6R à une concentration de 10 ng/ml sur la production de protéine S (Hooper et al., 1995). Sur un système relativement similaire, l'équipe de Gabay a montré que le hsIL-6R, même seul et à des concentrations de l'ordre de 100 ng/ml, pouvait induire une synthèse de CRP et de fibrinogène par des cellules d'hépatome (PLC/PRF/5) mais pas par des cultures primaires d'hépatocytes (Gabay et al., 1995). Cette stimulation sIL-6R dépendante est cependant beaucoup plus faible que celle induite par l'IL-6. De même, cette équipe confirmait l'action favorisante du sIL-6R sur la synthèse de protéines de la phase aiguë induite par l'IL-6. Une des conclusions apportée par cet article est le fait que le sIL-6R ne modifie pas la synthèse des protéines inflammatoires par des cellules primaires d'hépatocytes, et donc que le sIL-6R ne joue sans doute pas de rôle *in vivo* sur le foie.

Le sIL-6R favorise la prolifération cellulaire induite par l'IL-6 sur des fibroblastes synoviaux à des concentrations de 50 à 1000 ng/ml, des cellules cervicales immortalisées par HPV ou tumorales (1 nM/ml), d'où son rôle éventuel dans des phénomènes prolifératifs tumoraux ou inflammatoires (Iglesias et al., 1995; Mihara et al., 1995). Singh, en travaillant sur des fibroblastes humains démontra par ailleurs qu'une combinaison de IL-6 (50 ng/ml) et sIL-6R (250 ng/ml) pouvait induire l'activité aromatasase (l'une des enzymes intervenant pour la synthèse des hormones sexuelles) de ces cellules d'une manière plus importante que l'IL-6 seule (Singh et al., 1995).

Les travaux de Novick, confirment tout d'abord l'action "facilitante" du sIL-6R naturel sur la stimulation de la prolifération de cellules plasmocytaires induite par l'IL-6 (0.2 ng/ml) à des concentrations allant de 100 à 900 ng/ml, et aussi l'action synergique du sIL-6R (de 0.3 à 1000 ng/ml) et de l'IL-6 sur l'inhibition de la croissance de cellules de carcinome mammaire humain (Novick et al., 1992).

Un phénomène décrit par Tamura et son équipe doit cependant retenir notre attention (Tamura et al., 1993). Ces auteurs ont étudié l'effet de l'IL-6 seule (0.2 à 200 ng/ml) ou associée à des concentrations physiologiques (62.5 à 500 ng/ml) de sIL-6R sur des co-cultures de cellules de moelle osseuse et d'ostéoblastes de souris. L'IL-6 seule ne produit aucun effet notable, mais l'association induit la formation d'ostéoclastes. Cet effet, n'apparaissant que sous l'action de l'association IL-6/sIL-6R, pourrait être important *in vivo*,

quand il y a une augmentation du sIL-6R circulant. Cette explication tiendrait aussi dans le cadre de la différenciation des cellules souches embryonniques qui n'a lieu qu'en présence des deux molécules, du fait de l'absence de récepteur à l'IL-6 à la surface cellulaire (Nichols et al., 1994).

Enfin, et cela touche à la détermination de la concentration d'IL-6 par la méthode de prolifération des cellules murines B9, le sIL-6R peut induire, à des concentrations physiologiques (50 à 100 ng/ml), une prolifération des cellules et augmente la réponse à l'IL-6 (0 à 20 pg/ml) de ces cellules (Diamant et al., 1994). L'implication du sIL-6R dans les processus hématologiques est parfaitement illustrée par le travail d'Aderka et coll. qui décrit l'effet inhibiteur d'une combinaison d'IL-6 (6 ng/ml) et de son récepteur soluble (80 ng/ml) sur la prolifération de lignées cellulaires provenant de patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques (Aderka et al., 1993). L'effet de l'IL-6 sur ces cellules est largement majoré par la présence de récepteurs solubles.

Pour conclure ce chapitre concernant l'effet *in vitro* du sIL-6R, on peut clairement établir que cette protéine accroît les effets induits par l'IL-6 dans pratiquement tous les essais publiés. Son rôle spécifique pourrait être au niveau de la génération des ostéoclastes ou la maturation des cellules souches germinales, cellules où l'IL-6 seule ne produit aucun effet. Une extrapolation à des systèmes *in vivo* serait hâtive puisque l'on ne connaît pas exactement la forme exacte sous laquelle se trouve le récepteur soluble et sa concentration précise dans les tissus concernés. De plus les ratios IL-6-sIL-6R/gp130 et IL-6R/gp130 jouent probablement un rôle déterminant dans l'effet spécifique du sIL-6R.

2.3.4. Le récepteur soluble à l'IL-6 in vivo, données expérimentales

Il n'y a que peu d'études concernant l'activité du récepteur soluble *in vivo* du fait, d'une part, de la difficulté de produire cette protéine en quantité suffisante et que d'autre part la demi-vie relativement courte des cytokines implique l'utilisation de doses répétées lors de leur injection dans l'organisme. A ce jour, nous n'avons relevé que quelques travaux à ce sujet.

La première étude concerne l'effet au niveau du système nerveux central du sIL-6R, les auteurs ont montré que l'effet de l'IL-6 (1 ng) injectée en intra cérébro-ventriculaire était majoré par une co-injection de sIL-6R (10 ng), ceci sur des paramètres modifiés par l'IL-6: la mobilité et la prise de nourriture (Schobitz et al., 1995). Cette étude permet de dire que lors d'une augmentation de la concentration du sIL-6R et/ou d'une perturbation de la membrane hémato-méningée, l'effet central de l'IL-6 peut être majoré. Il faut souligner l'absence d'effet d'une injection de sIL-6R seul sur les paramètres étudiés.

La deuxième étude a un caractère beaucoup plus artificiel puisqu'elle porte sur un modèle de tumeurs transfectées *ex vivo* (Mackiewicz et al., 1995). Ces auteurs ont comparé l'évolution *in vivo* de cellules de mélanomes (B78) transfectées par de l'ADNc d'IL-6, de l'ADNc de sIL-6R ou les deux ensemble. Leurs travaux indiquent une prolifération similaire des cellules transfectées ou co-transfectées et des cellules sauvages (non modifiées) en culture, par contre la tendance à la formation de métastases et la morbidité des animaux étaient moindre lors de l'injection des cellules transfectées ou co-transfectées. Un certain nombre de points restent mal définis puisque ces auteurs ont utilisé de l'IL-6 humaine et du sIL-6R murin et les investigations quant aux mécanismes impliqués n'ont pas été développées. Cette étude serait à compléter sur un modèle totalement homologue murin.

Pour être exhaustif sur le sujet des systèmes non-homologues, les travaux récents de l'équipe de Rose-John doivent être discutés (Peters et al., 1996). Ces auteurs ont établi une lignée de souris transgéniques qui exprime sous le contrôle du promoteur de la PEPCK (phospho-énol pyruvate carboxy kinase) le récepteur soluble humain à l'IL-6. En comparant la réponse de la phase aiguë induite au moyen d'IL-6 humaine (capable d'agir sur le récepteur humain et murin) dans les souris normales, hétérozygotes ou homozygotes, ils déduirent que le récepteur soluble augmentait la réponse à l'IL-6 et induisait un allongement de la demi-vie de celle-ci. Ce système, bien que rigoureusement établi, manque de rigueur car on ne connaît pas exactement quelle est l'interaction du récepteur soluble humain avec la gp130 murine, et du récepteur murin avec l'IL-6 humaine; beaucoup de paramètres demeurent donc imparfaitement contrôlés. Paradoxalement, Weiergräber décrit une diminution de la demi-vie de l'IL-6 lorsque complexée à son récepteur soluble (Weiergraber et al., 1995). Ces dernières mesures ont été faites au moyen de récepteur soluble généré dans des cellules d'insectes, iodiné puis injecté à l'animal.

Dans un contexte un peu différent, il faut mentionner les travaux de l'équipe de Kishimoto, qui, en croisant des souris transgéniques pour le récepteur à l'IL-6 et celles pour l'IL-6R, ont obtenu des souris sur-exprimant la cytokine et son récepteur (Hirota et al., 1995). L'une des principales modifications observées est une augmentation de l'épaisseur des ventricules cardiaques. Celle-ci s'expliquerait par une stimulation permanente des gp130 cardiaques ce qui reproduirait de manière non régulée l'action de la CT-1, ceci sera confirmé lorsque des animaux transgéniques pour CT-1 seront créés (Ishikawa et al., 1996; Pennica et al., 1996). Aucune modification concernant d'autres paramètres n'a été étudiée.

2.3.5. Le récepteur soluble à l'IL-6: un protecteur de l'IL-6?

Dès 1989, Kishimoto et son équipe décrivent la possibilité d'une interaction entre l'IL-6 et des facteurs plasmatiques (Matsuda et al., 1989). Ils s'intéressent alors plus particulièrement à l'alpha-2 macroglobuline et trouvent que celle-ci pourrait servir de transporteur pour la cytokine. En effet, cette liaison de faible affinité préviendrait la dégradation de l'IL-6 par les protéases et augmenterait ainsi sa demi-vie. Plus tard, l'équipe de Sehgal rapporte des faits similaires mais précise qu'il s'agit en fait de complexes multimériques comportant en leur sein l'IL-6 (May et al., 1995; May et al., 1992). L'une des protéines décrites correspondrait au récepteur soluble de l'IL-6. Ainsi, il est probable que le récepteur soluble joue un rôle simplement passif dans le transport de l'IL-6 en plus de son rôle actif à la surface cellulaire. Cette notion de demi-vie augmentée par la génération de complexes multimériques est à rapprocher de ce qui a été décrit lors de l'administration à visée thérapeutique d'anticorps dirigés contre l'IL-6 (May et al., 1993; May et al., 1994; Montero-Julian et al., 1995). En effet, l'action à priori bénéfique de ces anticorps ont été estompés par l'augmentation de la demi-vie de l'IL-6 due à la formation de complexes immuns et un phénomène de rebond par relargage en fin de traitement.

Finalement, on peut envisager la situation, telle celle décrite pour les cellules placentaires ou les ostéoblastes, où l'IL-6 produite localement pourrait être transportée à un autre site et agir par l'intermédiaire de son récepteur soluble. Cette hypothèse implique

évidemment des mécanismes de régulation précis mais cela permettrait à des cellules dépourvues de gp80 de répondre à de l'IL-6 circulante.

La présence de récepteurs solubles circulants est quelque peu déconcertante si l'on considère que tout complexe IL-6/sIL-6R peut agir sur toute cellule possédant à sa surface des molécules gp130, soit la majorité des cellules de l'organisme. L'action précise du sIL-6R n'est donc pas clairement établie. Il faut souligner les travaux d'une équipe japonaise qui rapporte la présence de molécule de gp130 soluble circulante (sgp130), protéine qui aurait la capacité de se lier au complexe sIL-6R/IL-6 et donc d'inhiber son action à la surface cellulaire par compétition avec la gp130 membranaire (Matsuda and Hirano, 1994; Narazaki et al., 1993; Yasukawa et al., 1992). La concentration de cette protéine de 500 à 1000 ng/ml dans le sérum pourrait en faire un inhibiteur potentiel du complexe IL-6/sIL-6R (Klein, 1995).

2.3.6. Génération du récepteur soluble à l'IL-6

La génération de facteurs solubles dérivés de protéines membranaires résulte dans la grande majorité des cas soit d'un clivage protéolytique par des enzymes attaquant la partie extracellulaire de la molécule soit d'un épissage différentiel d'un ARNm précurseur commun (Rose-John and Heinrich, 1994). Dans le cas des cytokines, la protéine soluble est le plus souvent un mécanisme de régulation qui va bloquer, par compétition, l'action du ligand sur son récepteur. De nombreux cas ont été rapportés tels que les récepteurs pour l'IL-1, l'IL-4, le LIF ou le TNF. Quant au récepteur pour l'IL-6, la situation est plus complexe, d'une part parce qu'il s'agit d'un agoniste et d'autre part parce que le mécanisme de génération reste controversé (Rose-John et al., 1995).

2.3.6.1. Epissage différentiel

C'est Lust et coll. qui décrivent les premiers la présence d'un second messenger dont la caractéristique, par rapport à l'ARN messenger codant pour la protéine membranaire, était une délétion de la partie codant pour la séquence transmembranaire (Lust et al., 1992; Lust et al., 1995). Leur stratégie, reprise par d'autres équipes, a été de générer deux oligonucléotides complémentaires des régions adjacentes à la partie codant pour la séquence

transmembranaire, puis de faire une RT-PCR sur des ARNm provenant de différentes cellules ou lignées cellulaires. Par cette technique, ils obtinrent deux transcrits provenant soit de leucocytes périphériques, soit de moelle osseuse de patients atteints de leucémie myéloïde, soit de lignées B transformées (U266, CESS). En exprimant un transcrit comportant cette délétion, ils démontrèrent que cette protéine possédait bien les caractéristiques du sIL-6R recombinant. Körholz et son équipe décrivirent le même processus sur une lignée B et sur des lymphocytes B purifiés du sang et stimulés par un phorbol ester (PMA) (Körholz et al., 1994). De plus, cette équipe démontra la présence de la forme soluble dans le surnageant de ces cultures au moyen d'anticorps spécifiques. Des travaux similaires, dirigés par Horiuchi, mais cette fois sur des lymphocytes T ou des cellules de la lignée granulo-monocytaire, confirmèrent la présence d'un second transcrit par PCR (Horiuchi et al., 1994). Très récemment les travaux de Oh et coll. indiquèrent la présence de récepteurs solubles à l'IL-6 dans le surnageant d'une lignée de cellules de cancer du sein (T47D) et du mRNA spécifique pour cette protéine (Oh et al., 1996). Enfin, Snyers et coll. publièrent récemment le clonage d'un pseudo-gène, à partir d'ARNm d'hépatomes humains (Hep3B), ayant une forte homologie avec la séquence décrite par Lust, et qui correspond au IL-6R avec une délétion de 94 pb au niveau de la partie transmembranaire (Snyers et al., 1995).

2.3.6.2. Clivage protéolytique

L'hypothèse du clivage protéolytique du récepteur membranaire a surtout été étudiée par l'équipe de Rose-john. Dès 1992, cette équipe montre que des cellules COS-7 transfectées avec un vecteur d'expression codant pour l'IL-6R (gp80) peuvent, après stimulation avec un ester de phorbol (PMA), relarguer dans le milieu une forme soluble du récepteur à l'IL-6 (Mullberg et al., 1992). Ce relargage n'est pas inhibé par les anti-protéases classiques et les auteurs suggèrent l'appartenance de l'enzyme à une classe particulière. Une seconde publication reprend les mêmes résultats et décrit en plus un phénomène similaire à partir de monocytes sanguins (Mullberg et al., 1993). Ce récepteur est prouvé biologiquement actif de par son effet sur leur modèle de cellules HepG2 sur-exprimant l'IL-6 (ces cellules sont devenues insensibles à l'IL-6 et ne produisent des protéines de la phase aiguë qu'en présence de sIL-6R). Dans le même temps, cette équipe décrit le relargage, par des cellules MDCK

transfectées par des vecteurs d'expression exprimant la gp80 ou la gp130, de la forme soluble de la gp80 (sIL-6R) et de la gp130 (sgp130) (Mullberg et al., 1993). Dans ces travaux, ils démontrent que ces protéines peuvent former des complexes trimériques avec l'IL-6. En séquençant la partie COOH terminale du récepteur soluble (gp54), cette équipe réussit à déterminer le site probable de clivage et étudièrent le comportement de protéines comportant des mutations dans cette région (Mullberg et al., 1994). Leurs travaux conclurent qu'une dizaine d'AA étaient importants pour le phénomène de protéolyse et que la séquence retrouvée ne correspondait à aucune séquence jusqu'alors décrite comme susceptible aux protéases. Plus récemment, Müllberg et coll. ont caractérisé un composé capable d'inhiber le relargage du récepteur à l'IL-6 (Mullberg et al., 1995). Cette molécule ou TAPI (TNF- α Protease Inhibitor) est un inhibiteur de métalloprotéases qui a la propriété d'inhiber aussi le relargage du TNF α , et du récepteur p60 du TNF. Ainsi, la protéase responsable du clivage protéolytique de la gp80 appartiendrait à une famille de métalloprotéases proche de celle impliquée dans la libération du TNF.

Ainsi, deux grandes théories concernant la synthèse de la gp54 ou sIL-6R, protéolyse ou épissage différentiel sont décrites et peuvent être considérées comme complémentaires. En effet, on peut considérer les deux mécanismes comme intervenant dans des cellules différentes et régulés par des phénomènes propres.

3. L'INFLAMMATION ET LA REPONSE HEPATIQUE

3.1. Introduction

Que ce soit à la suite d'une blessure, d'une infection, ou de tout autre traumatisme infligé à un individu, un certain nombre de mécanismes vont se développer afin d'essayer de restaurer l'état initial dans lequel se trouvait le tissu impliqué et sont regroupés sous le terme "d'inflammation". Décrire en quelques mots ce phénomène complexe et encore imparfaitement expliqué serait illusoire, nous nous contenterons donc d'en livrer les points clés tout en restant dans le cadre des cytokines du type IL-6.

3.2. La réaction locale

3.2.1. Initiation

Au site du traumatisme vont se produire une succession d'événements que l'on peut classer chronologiquement. (Roitt, 1994; Solito and Russo-Marie, 1995) Une réaction immédiate intervient, elle est principalement due au relargage de médiateurs préformés et présents dans les cellules se trouvant localement, telles que les polymorphonucléaires (PMN) les mastocytes et les macrophages. Ces médiateurs, en partie regroupés dans le tableau 3, proviennent principalement des granules présentes dans les mastocytes, les PMN, les macrophages et les plaquettes mais résultent aussi de l'activation de diverses enzymes tels que la thrombine, la NO-synthétase, la NADPH oxydase, la lipoxigénase (qui donnera les LTC₄, LTD₄ et LTB₄) et les cyclo-oxygénases (fournissant les prostaglandines et thromboxanes). Les médiateurs libérés des cellules précitées- première ligne de défense- vont déclencher le recrutement d'autres cellules identiques ou plus spécialisées telles que les plaquettes et les lymphocytes et une amplification des processus précités. Il faut mentionner l'intervention du système complément dont les produits d'activation interviennent de façon primordiale dans le processus du déclenchement et du maintien de l'état d'inflammation.

Tableau 3: Principaux médiateurs locaux de l'inflammation(d'après (Roitt, 1994))

Activité du Médiateur						
	Dilatation	Constriction	Augmentation de perméabilité	Augmentation de l'expression des molécules d'adhésion		Chimiotactisme des PMN
				Endothélium	PMN	
Histamine	+		+	++		
Bradykinine	+		++			
PGE₂/PGI₂	+++		Potentialisation de l'effet d'autres médiateurs			
Leucotriène D4		+				
Leucotriène C4		++	+			
C5a			++	+	++	+++
Leucotriène B4			++		++	+++
f.met.leu.phe			++		+	+
PAF	+		++		++	
IL-8					++	++
IL-1				++	++	
TNFα				++	++	

3.2.2. Amplification

L'ensemble des médiateurs présents localement vont produire un environnement complexe dont la fonction primordiale sera de recruter puis d'activer de nouvelles cellules afin d'essayer de restaurer l'intégrité du site. L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, les gradients chimiotactiques et la modification de la perméabilité vasculaire seront autant d'éléments facilitant l'arrivée des cellules compétentes, tandis que les médiateurs

sans cesse renouvelés activeront celles ci. L'afflux de cellules marquera le passage à la deuxième phase de défense concomitamment à l'apparition des cytokines de "première vague" produites par les macrophages telles l'IL-1, le TNF α et l'IL-8. Ces cytokines renforcent les effets déjà mentionnés des autres molécules et cytokines déjà présentes (provenant en particulier des mastocytes), et stimulent les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales qui, à leur tour, vont produire les cytokines et les médiateurs qui constitueront la "deuxième vague".

Parmi les cytokines libérées secondairement, il faut citer l'IL-6 et les "IL-6 like" cytokines (LIF, OM, IL-11, CT-1) mais aussi l'IL-8, l'IL-10, le TGF α , le TGF β et le GM-CSF. Ce sont ces protéines qui vont induire la phase systémique de la réaction inflammatoire (Richards et al., 1991). Ainsi, l'IL-1, le TNF et l'IL-6 vont modifier la thermorégulation en agissant sur l'hypothalamus et en élevant l'homéostasie thermique, l'IL-1 et l'IL-6 par leur action sur l'axe adrénalo-pituitaire induiront une augmentation de la cortisolémie et une régulation négative des gènes des cytokines, enfin, les cytokines "IL-6 like" vont stimuler le foie et la synthèse des anti-protéases .

3.2.3. Résolution

L'ultime but étant le retour à l'état initial, de nombreux mécanismes de régulation sont mis en jeu pour contrôler la réaction inflammatoire. Parmi ceux ci, il faut mentionner différents médiateurs dont les rôles principaux sont, soit de réguler le système du complément, c'est le cas du C1 inhibiteur, du CR1 (complement receptor 1), ou du DAF (decay accelerating factor), soit de bloquer les protéases (anti-protéases) ou les systèmes d'attaque membranaire (CD59). Au niveau cellulaire de nombreuses cytokines modulent aussi la puissance de ces mécanismes, et pour ne citer que certains, le TGF β diminue l'activité du macrophage et des cellules NK activées; l'IL-10 inhibe la production de NO, la présentation de l'Ag et la production de cytokine du macrophage; enfin l'IL-1RA (Receptor Antagonist) bloque l'action de l'IL-1. D'autres produits tels que la PGE₂ diminue la production des cytokines produites par les macrophages et les lymphocytes activés tandis que les glucocorticoïdes modulent l'activité des monocytes et des PMN.

La "touche finale" sera surtout gouvernée par le TGF β qui stimule la prolifération fibroblastique et la synthèse de la matrice extracellulaire.

Bien évidemment, au delà de ce scénario trop bien orchestré, de nombreuses variantes sont possibles dont certaines conduiront au stade d'inflammation chronique, exemple type du non-aboutissement de la restauration de l'homéostasie et de la persistance d'un état d'activation.

3.3. La réaction hépatique de la phase aiguë (Acute Phase Response)

Véritables marqueurs de l'inflammation au niveau systémique, les protéines de la phase aiguë sont le résultat de l'action de cytokines secrétées initialement au site de l'inflammation et qui agissent au niveau hépatique (cf. figure 6). Bien que l'IL-1 et les cytokines "IL-1 like" puissent induire les protéines de la phase aiguë, les cytokines "IL-6 like" possèdent une activité bien plus importante à cet égard et vont donc réguler, par l'intermédiaire de certaines protéines hépatiques, de nombreux systèmes protéolytiques mis en jeu lors de la réaction inflammatoire. Le tableau 4 décrit brièvement les protéines régulées au niveau hépatique par chaque groupe de cytokines ou de médiateurs (Xing et al., 1995).

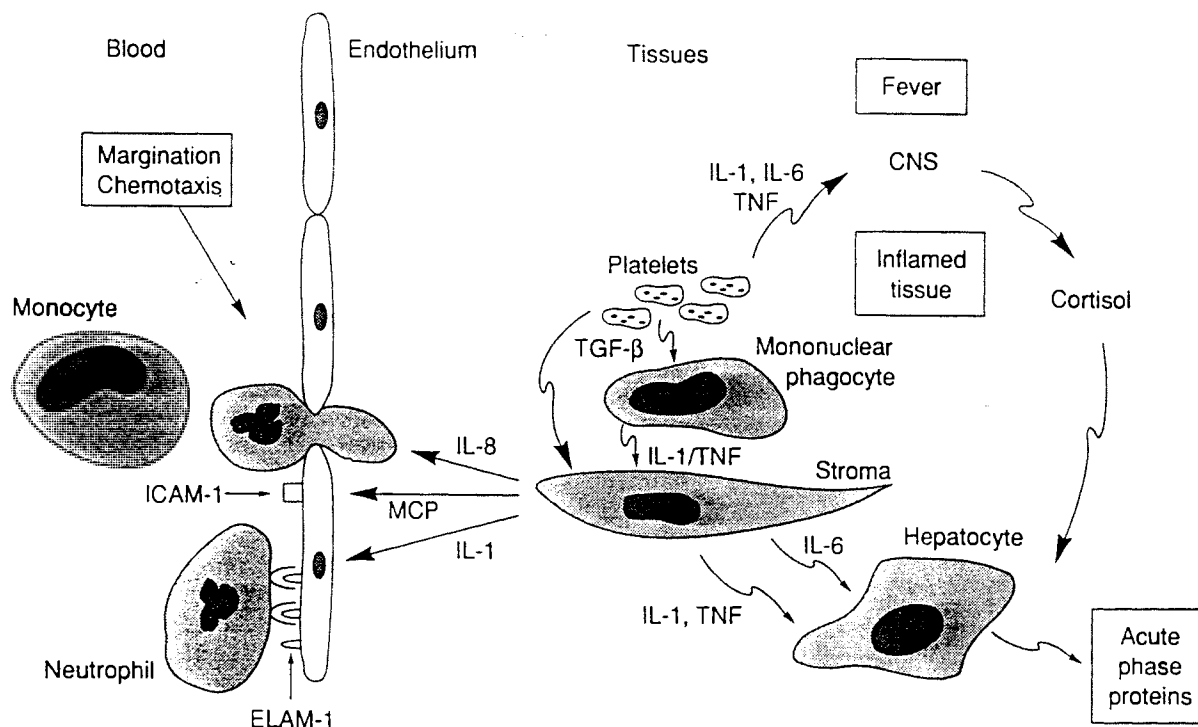


Figure 6: La réponse de la phase aiguë et les cytokines (d'après (Baumann and Gauldie, 1994)).

Les plaquettes et les phagocytes mononucléés sécrètent, au site de la destruction tissulaire, des cytokines dites "précoces" telles que l'IL-1 et le TNF. Ces cytokines vont activer les cellules stromales et endothéliales adjacentes qui synthétiseront à leur tour d'autres cytokines impliquées dans le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires. La réponse hépatique, de même que l'activation de l'axe adrénalo-pituitaire, interviendront suite au relargage d'une nouvelle vague de cytokines.

Tableau 4: Régulation des protéines de la phase aiguë par divers facteurs

Cytokines et autres médiateurs	Protéines de la phase aiguë (APP)
<i>Cytokines type IL-1</i> (IL-1α, IL-1β, TNFα, TNFβ)	<i>APP de type 1:</i> - C-Reactive Protein (CRP) - Serum Amyloïde A (SAA) α1 acid glycoprotéine - Complément C3 - haptoglobine (rat) - Hemopéxine (rat) - Inhibition des APP de type 2
<i>Cytokines type IL-6</i> (IL-6, LIF, OM, CNTF, IL-11)	<i>APP de type 2:</i> - Fibrinogène (α,β,γ) α2 macroglobuline (rat) - Thiostatine (rat) α1-antitrypsine α1-antichymotrypsine - haptoglobine - Hemopéxine - Céruléoplasmine Action synergique sur les APP de type 1 avec les cytokines de type 1
Glucocorticoïdes	Effet mineur sur les APP en général, fort effet inducteur sur l'α1 acid glycoprotéine Effet synergistique sur l'effet des cytokines sur les APP
Insuline	Réduction de l'effet des cytokines type IL-1 et IL-6 sur les APP
HGF*, FGF*	Peu de réduction de l'effet des cytokines type IL-1 et IL-6 sur les APP Exacerbation de l'effet des cytokines type IL-1 sur α1 acid glycoprotéine et complément C3

*: HGF=Hepatocyte Growth Factor, FGF=Fibroblast Growth Factor

D'une manière générale, la réponse de la phase aiguë est limitée dans le temps et ne dure que 24 à 48 heures. Les mécanismes qui gèrent la régulation temporelle ne sont pas connus, tout au plus peut-on émettre des hypothèses concernant le rôle de la demi-vie relativement courte des cytokines, l'existence de cytokines à caractère inhibiteur telles l'IL-10 ou l'IL-4 ou encore la présence de récepteurs solubles inhibiteurs tels l'IL-1 RA ou le LIFsR (Baumann and Gauldie, 1994). Le retour à la normale est à opposer aux processus qui se mettent parfois en place et induisent un passage à la chronicité. De nombreuses étapes peuvent alors être incriminées, leurs connaissances seront indispensables au développement de stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires efficaces.

3.4. Les cytokines apparentées à l'IL-6 (LIF, OM, CNTF, IL-11, CT-1)

Lorsque l'on s'intéresse à la stimulation des protéines de la phase aiguë, on remarque aisément que de nombreuses cytokines, autres que l'IL-1 ou l'IL-6, peuvent produire des effets similaires. Que ce soit le LIF, l'OM, le CNTF, l'IL-11 ou la CT-1, tous ont une structure proche de celle de l'IL-6 et une activité similaire au niveau hépatique (Baumann and Gauldie, 1990; Baumann and Schendel, 1991; Peters et al., 1995; Richards et al., 1992; Schooltink et al., 1992). Ce fait, aussi surprenant soit-il, doit se concevoir en gardant en mémoire que ces cytokines d'une part possèdent des homologies structurelles importantes et d'autres part qu'elles agissent par l'intermédiaire d'un récepteur partiellement identique (Gu et al., 1996; Taga and Kishimoto, 1995). En effet, toutes partagent la chaîne β (ou gp130) du récepteur à l'IL-6 et leurs actions ne seront donc différenciées que par la présence ou non de leur récepteur spécifique ou chaîne α à la surface cellulaire. Il ne serait pas possible de détailler précisément toutes les fonctions partagées par ces cytokines mais nous avons tenté de résumer nos connaissances dans le tableau récapitulatif suivant (Tableau 6). Ce point est particulièrement important car il souligne la difficulté d'étudier l'une de ces cytokines, en particulier *in vivo*; le chevauchement des effets biologiques de ces cytokines les rendent complémentaires et redondantes. Ce phénomène est particulièrement bien traduit lors de l'étude des animaux "knock out" pour l'une de ces protéines; il n'y a en général que peu d'effets phénotypiques car un phénomène compensatoire s'installe rapidement. Cependant,

lorsqu'elles existent, les anomalies traduisent une action spécifique de la cytokine sur une cellule ne portant que le récepteur spécifique de celle-ci (Taverne, 1993).

Tableau 5: Activités communes des cytokines "IL-6 like".

Le récepteur des cytokines appartenant à la famille de l'IL-6 partagent une chaîne commune, la gp130 et leurs mécanismes de transduction du signal sont très similaires. Les activités biologiques de ces cytokines sont souvent identiques. Ce tableau donne un aperçu des activités des différentes cytokines sur plusieurs systèmes. (ND, not determined)

BIOLOGICAL ACTIVITIES	IL-6	LIF	OSM	CNTF	IL-11	CT-1
Induction of differentiation of M1 myeloid cells	+	+	+	ND	+	+
B9 cell proliferation	+	-	+	-	+	-
Enhancement of IL-3 dependent, blast cell colony formation	+	+	-	ND	+	ND
Differentiation of B cells into plasma cells	+	-	ND	ND	+	-
Stimulation of megakaryocyte maturation	+	+	ND	ND	+	+
Stimulation of Kaposi's sarcoma cells	+	ND	+	ND	ND	ND
Induction of acute phase proteins in hepatocytes	+	+	+	+	+	+
Inhibition of embryonic stem cell differentiation	-	+	ND	+	ND	+
Trophic activity for neurons	+	+	ND	+	ND	ND
Inhibitory effect on proliferation of sympathetic neuroblasts	-	+	ND	+	+	+
Enhancement of survival of ciliary neurons	ND	ND	ND	+	ND	+
Induction of hypertrophy in cardiac myocytes	ND	+	+	ND	+	+
Promotion of cardiac myocyte survival	-	+	ND	-	ND	+

D'après des données de (Barton et al., 1994; Begley, 1994; Burger and Gramatzki, 1993; Kishimoto et al., 1992; Miyajima et al., 1992; Pennica et al., 1995; Rose et al., 1994; Zhang et al., 1994)

4. LES ADENOVIRUS

4.1. Données générales

4.1.1. physiopathologie

C'est à Rowe et ses collaborateurs que l'on doit l'isolement du premier adénovirus en 1931. Depuis, ce virus a fait l'objet de nombreux travaux, il appartient à la famille des Adenoviridae et compte plus de 40 sérotypes. D'un point de vue purement clinique, les adénovirus ont été tout d'abord caractérisés par le fait qu'ils ne donnent que des pathologies frustres telles que pharyngites, affections aiguës du système respiratoire supérieur, conjonctivites et pour certains types cystites hémorragiques ou gastro-entérites. En 1962, l'adénovirus type 12 fut impliqué dans des processus tumoraux chez les rongeurs mais cela n'a jamais été démontré chez l'homme et, en règle générale, on peut dire que ces virus, chez l'homme, ne causent que des pathologies bénignes.

4.1.2. Structure

Ce sont des virus non enveloppés, à structure icosahédrique de 65 à 80 nm de diamètre (Horwitz, 1990). Des 12 sommets de ce virus pointent les "fibres" (fiber). La capside ou enveloppe protéique est constituée de 252 capsomères dont 240 sont des "hexons" et 12 des "pentons" d'où partent les fibres entourées de 6 hexons. Il faut noter la relative toxicité des "pentons" qui peuvent causer, à forte concentration, un effet cytopathique direct de type toxinique. Par migration sur gel de polyacrylamide du virus dénaturé, on peut classer les protéines constitutives d'après leurs tailles. Brièvement, une nomenclature de II à IX a été attribuée aux différents constituants, les protéines II, III et IV font partie des capsomères et des fibres, V et VII sont associées à l'ADN viral, enfin, VI, VIII et IX participent à l'assemblage des particules et sont associées aux protéines des hexons. L'ADN viral est linéaire, double brin et sa taille varie de 30 à 38 kb. L'une des caractéristiques du génome est de posséder une protéine de 55 kDa liée de façon covalente à son extrémité 5' et

dénommée "Terminal Protein" ou "TP", indispensable pour la réplication virale. On retrouve aux deux extrémités du génome des séquences de type ITR (Inverted Terminal Repeat).

4.1.3. Mécanisme infectieux

L'infection de cellules par l'adénovirus implique l'attachement de celui-ci à des récepteurs, non encore caractérisés, par l'intermédiaire des fibres (Goldman and Wilson, 1995). L'internalisation du virus, quant-à elle, met en jeu des intégrines cellulaires du type $\alpha V\beta 3$ ou $\alpha V\beta 5$ (Huang et al., 1995).

4.1.4. Réplication virale

La réplication des adénovirus suit un déroulement particulier dans le noyau de la cellule hôte, que l'on peut diviser en deux phases: précoce (E) et tardive (L), cette dernière correspondant à la réplication d'ADN proprement dite. Chaque phase peut être caractérisée, entre autres, par le type de protéines produites (cf. figure 7). E1A est la première protéine synthétisée et est pour cela appelée immédiate/précoce, son mode d'action bien qu'imparfaitement connu est la "trans-activation" qui va permettre la transcription des gènes précoces et déclencher le cycle réplcatif. En plus de cette fonction indispensable à la réplication virale, elle est impliquée dans les processus d'immortalisation et de transformation de certaines cellules. E1B est la seconde protéine à être produite, elle protège l'ADN viral lors de sa réplication et lorsqu'elle est associée à E1A peut induire l'apparition d'un phénotype à caractère transformé. E1A et E1B peuvent ainsi coopérer pour induire la transformation cellulaire, sans doute par interaction avec des gènes répresseurs de tumeurs tel P53. La région E2 code pour des protéines impliquées dans la réplication virale (DNA polymérase, DNA binding protein...), E4 a été démontrée importante pour la réplication virale, le blocage de la synthèse protéique de la cellule hôte (Host cell shut-off) et l'assemblage du virion. La région E3 n'est pas indispensable pour la réplication mais semble interférer avec les mécanismes d'immunité cellulaire et les phénomènes de "camouflage" du virus (baisse de l'expression des molécules du CMH de classe I, à la surface cellulaire). Une fois la phase précoce terminée, il y a activation du Major Late Promoter (MLP) agissant en *cis*, et qui sera responsable de la

synthèse d'au moins 13 ARNm différents. La constitution des particules virales a lieu dans le noyau qui libérera de nouveaux virions lors de sa lyse (Ginsberg, 1984).

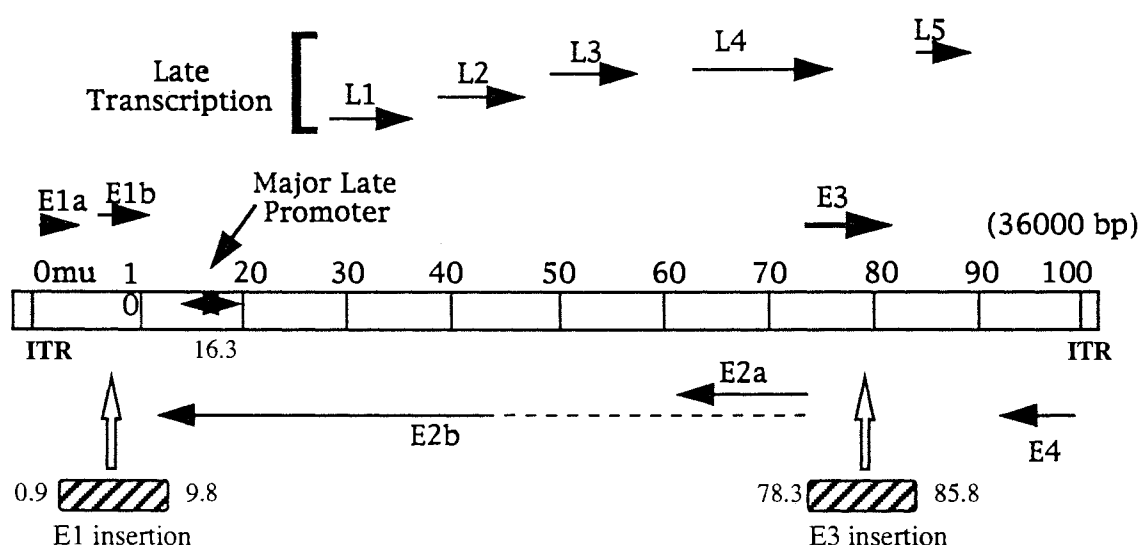


Figure 7: Le génome adénoviral (Adapté de (Ginsberg, 1984)).

Structure du génome viral et des différents ARNm. Les transcrits précoces sont repérés par la lettre "E" et les tardifs par la lettre "L". Les flèches représentent l'orientation de la transcription et les régions approximatives codant pour les différents transcrits. Les régions d'insertion sont repérées par les rectangles zébrés sous le génome. (ITR, Inverted Terminal Repeat; mu, map units).

4.2. Les adénovirus recombinants.

4.2.1. Généralités

L'étude extensive de la biologie des adénovirus a permis de démontrer la possibilité de modifier certaines parties du génome viral sans modifier fondamentalement le comportement du virus vis-à-vis de ses hôtes. De plus, l'adénovirus s'est montré inoffensif lors de la stratégie vaccinale américaine, lors de laquelle, des milliers de recrues se sont vues administrer le virus non atténué sans effet secondaire notable (Top et al., 1971). Les autres propriétés intéressantes des adénovirus utilisés comme vecteurs sont sa simplicité de manipulation, l'obtention de titres viraux importants (jusqu'à 10^{12}), et finalement la possibilité d'insérer des gènes relativement conséquents. En effet, on peut, sans compromettre la survie du virus, déléter de nombreuses régions du génome viral (cf. figure 8) (Graham and Prevec, 1991). Toute une partie de E3, environ 3 kb, peut être délétée, la partie E1 (2.9 kb) à condition de travailler sur des cellules 293, cellules embryonniques de rein humain qui sont transfectées de manière stable avec le gène codant pour E1 (11% de l'extrémité gauche du virus) et une partie de E4 en fin de génome. Le virus ainsi "allégé" peut recevoir jusqu'à 8.3 kb d'ADNc étranger (Bett et al., 1993). La limite supérieure, que l'on ne peut physiquement dépasser, est définie par la taille maximale du génome viral incluable dans la capside, soit 105% de la taille initiale (Bett et al., 1994). Ainsi, une augmentation de l'insert au dessus de 7.8 kb rend le virus beaucoup plus instable et donc beaucoup plus délicat à manipuler.

4.2.2. Construction

La construction des adénovirus recombinants est relativement simple du fait de développement de plasmides bactériens qui contiennent de façon complémentaire le génome entier (moins les délétions) de l'adénovirus (cf. figure 8) (Hitt et al., 1995). La stratégie utilisée consiste à co-transfecter des cellules 293 avec un plasmide contenant l'insert et toutes les séquences nécessaires à l'empaquetage (packaging signal) d'une particule virale et un second plasmide complémentaire de ce dernier et contenant l'ensemble des gènes nécessaires à la production de particules virales sauf le signal d'empaquetage. Par recombinaison

homologue (faisant intervenir environ 2 kb, communs aux deux plasmides) intracellulaire et uniquement dans ce cas, il y aura formation d'un génome apte à la production de particules virales. L'absence de séquence d'empaquetage proscrit toute production de virus qui n'auraient pas recombines. L'insert peut-être positionné dans la partie E1 ou E3 du génome viral (cf. figure 7). Dans le premier cas, il s'agit de virus déficient pour la réplication, du fait de l'absence de production des protéines E1a et E1b, et dans le second de virus pouvant se répliquer dans des cellules humaines, E3 n'étant pas requise pour la réplication virale. Chaque insert est flanqué d'un promoteur et d'une séquence permettant la polyadénylation. Le choix du promoteur s'est révélé très important selon l'hôte ou le tissu avec lequel on travaille.

4.2.3. Applications

Un avantage majeur des adénovirus comme vecteurs de gènes étrangers est sa capacité à infecter de nombreux types cellulaires. De fait, différents travaux ont rapporté l'infectivité des cellules pulmonaires, des hépatocytes, des cellules musculaires lisses ou striées, des cellules rétiennes, des cellules d'îlots pancréatiques, de différentes cellules du système nerveux central, des cellules mononucléées de la moelle, des synoviocytes et des cellules des glandes salivaires (Kozarsky and Wilson, 1993). Cette grande capacité d'infection associée au fait que les cellules n'ont pas besoin d'être en phase répliative (contrairement aux rétrovirus) pour être infectables font de l'adénovirus un outil exceptionnel et facilement utilisable .

L'utilisation des adénovirus, à notre avis et considérant les vecteurs à notre disposition, ne doit pas être considérée comme un moyen de suppléer à un gène déficient de manière permanente mais plutôt de profiter du temps limité durant lequel un gène est exprimé lorsque porté par un tel vecteur. Ainsi avons nous prouvé que ces vecteurs sont très utiles dans l'étude des fonctions des cytokines ou dans des situations où une expression transitoire est nécessaire (Richards et al., 1995). Les modèles animaux développés grâce à ces vecteurs sont une alternative intéressante aux animaux transgéniques qui sont soumis à un gène donné depuis la conception de l'animal. L'atout des vecteurs recombinants est aussi la possibilité d'étudier dans des conditions précises (pathologiques ou autres) la fonction d'un gène.

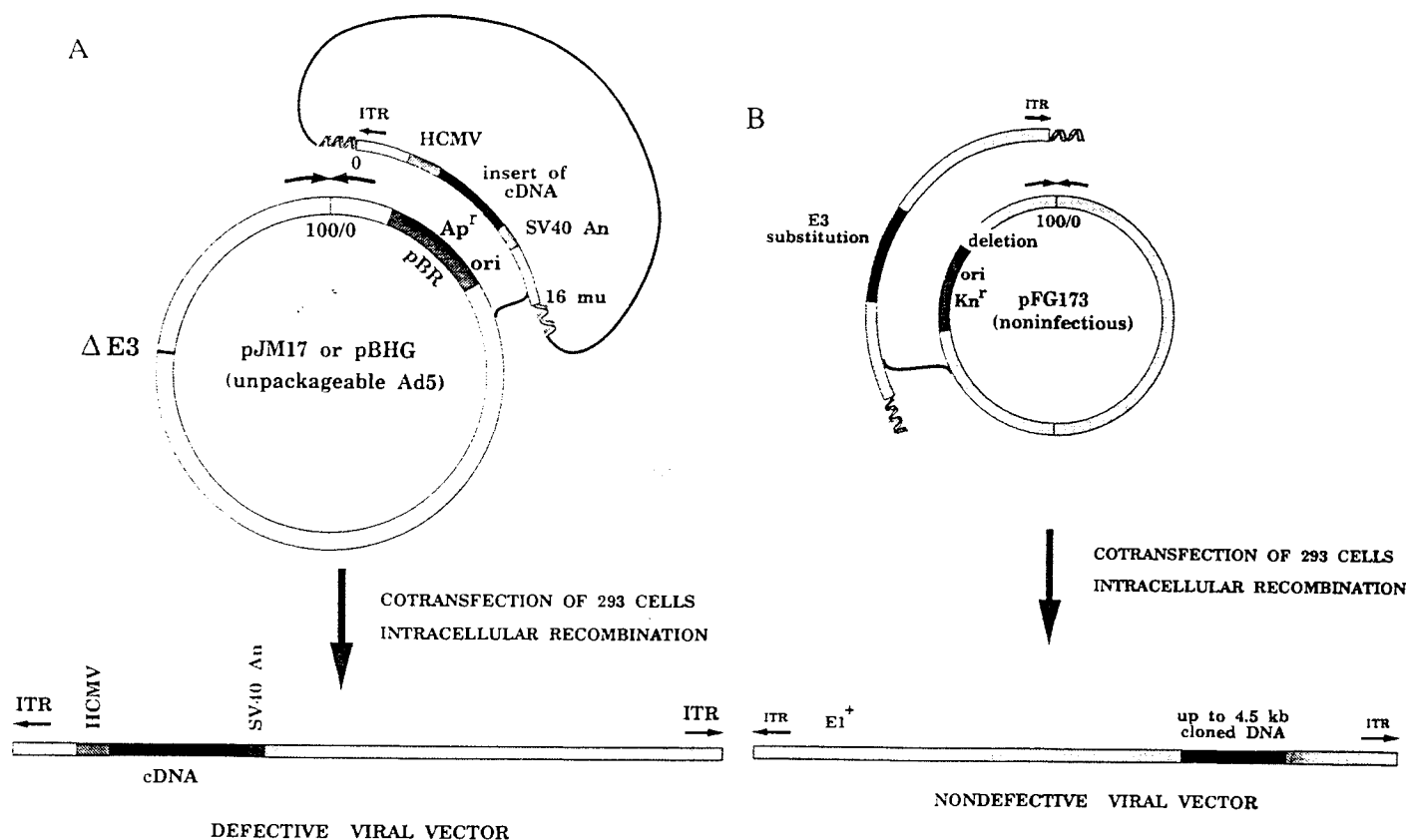


Figure 8: Construction des adénovirus recombinants (d'après (Hitt et al., 1995)).

A. Schéma d'insertion d'un gène en position E1 dans le génome adénoviral. Les cellules 293 sont co-transfectées avec un plasmide circulaire contenant le génome viral dont la partie E1 et le signal d'emballage ont été délétés, et un plasmide vecteur contenant le gène à exprimer flanqué de séquences régulatrices et la partie gauche du génome viral dont les séquences d'emballage. Une recombinaison homologue impliquant environ 2 kb communes aux deux plasmides génère le virus représenté au bas de la figure.

B. Schéma d'insertion d'un gène en position E3 dans le génome adénoviral. Les cellules 293 sont co-transfectées avec un plasmide circulaire contenant le génome viral dont la partie E3 a été délétée et un plasmide contenant le gène à insérer et la partie droite du génome viral. Le virus recombinant obtenu peut se répliquer et l'expression du transgène est en partie régulée par le promoteur MLP, Major Late Promoter. (ITR, Inverted Terminal Repeat; mu, map units; ori, origin)

5. OBJECTIFS DU TRAVAIL PRESENTE

Les brefs rappels que nous venons d'effectuer, nous ont permis de faire le point sur nos connaissances du récepteur soluble à l'interleukine-6. Brièvement, cette molécule semble être un agoniste ou au moins agir en synergie avec l'interleukine-6 *in vitro* sur différents systèmes cellulaires. Son mécanisme de génération est partiellement connu et pourrait, selon la cellule étudiée, mettre en oeuvre soit un clivage enzymatique, soit une synthèse *de novo* à partir du gène du IL-6R puis un épissage différentiel de l'ARNm. *In vivo* cette protéine est retrouvée de manière constante chez l'homme et sa concentration varie positivement ou négativement selon les états, physiologique ou pathologique. Aucune corrélation ne semble parfaitement établie entre les variations de concentration du récepteur soluble et la gravité d'un état donné ou la concentration d'IL-6 circulante. Chez la souris, les données sont très similaires et indiquent aussi des variations de concentrations en fonction de l'état physiologique de l'animal. Il faut préciser que selon la souche de souris étudiée, la concentration varie et se trouve parfois à des taux très bas.

Les objectifs que nous nous sommes fixés ont été d'établir un système expérimental chez le rat qui nous permettrait d'étudier le rôle du récepteur soluble de l'IL-6 *in vivo*. Chez cet animal, aucune donnée n'était à notre disposition, seules avaient été rapportées les séquences nucléotidiques et protéiques de l'IL-6 et de son récepteur ainsi que l'étude des variations de l'ARNm de ces deux protéines *in vitro* et lors de stimulations diverses (Baumann et al., 1990; Gadiant and Otten, 1993; Gadiant and Otten, 1994; Geisterfer et al., 1993; Geisterfer et al., 1995; Munck Petersen et al., 1990). Etant donné le peu d'informations sur les effets du IL-6R que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, il fallait établir un système homologue qui permettrait de répondre à certaines questions essentielles concernant le récepteur soluble à l'IL-6. L'une de ces questions, qui revient très souvent lors des discussions sur cette molécule, est de savoir ce qui régule l'effet du sIL-6R *in vivo* car sa présence associée à celle de l'IL-6 devrait induire une activité sur toute les cellules portant gp130 (la protéine transductrice). Nous pouvons aussi citer les interrogations suivantes: quels sont les effets *in vitro* du récepteur soluble de rat, retrouve-t-on des effets agonistes identiques à ceux décrits avec la protéine humaine en particulier sur les cellules hépatocytaires; quel est l'effet d'une

augmentation transitoire du sIL-6R *in vivo*; cette protéine existe-t-elle de manière naturelle chez le rat; quel est l'effet d'une augmentation du sIL-6R sur les protéines de la phase aiguë lors d'une inflammation ou en état "normal"; quels sont les effets d'anticorps spécifiques dirigés contre cette protéine. Nous verrons que loin de répondre à toutes ces questions, parfois complexes, nous avons été amenés à observer d'autres phénomènes en étroite relation avec l'interaction IL-6/IL-6R.

Initialement, nos connaissances sur le système IL-6/IL-6R chez le rat était très succinctes mais le laboratoire de J. Gauldie, outre son expérience dans le domaine de l'inflammation, possédait déjà l'IL-6 de rat et avait mis au point sa préparation dans *E. coli*. Les autres réactifs pour ces protéines étaient alors inexistantes et notre première tâche était de mettre en oeuvre leurs préparations. Dans un premier temps, notre stratégie a été de produire dans un système procaryote une quantité suffisante de récepteur soluble à l'IL-6 de rat afin, d'une part, d'étudier son effet dans différents systèmes *in vitro*, et d'autre part de générer des anticorps spécifiques contre celle-ci. La production d'anticorps était aussi une étape cruciale car elle devait nous fournir un réactif indispensable pour la détection de la protéine lors de nos investigations *in vivo* et nous permettrait d'apprécier le potentiel de notre vecteur adénoviral. La deuxième partie étant plus orientée sur des effets *in vivo*, nous nous sommes intéressés aux vecteurs adénoviraux, vecteurs ayant prouvé leurs potentiels quant à l'administration de gène à l'animal. Cette construction virale se révéla être très utile d'une part pour générer des anticorps et d'autre part pour observer *in vivo* quels étaient les effets biologiques de cette protéine lors d'une réaction inflammatoire.

Nous verrons que, confrontés à d'importants problèmes lors de la production de cette protéine recombinante chez *E. coli*, nous avons dû changer de technologie et mettre en place tout le système d'expression dans les cellules d'insecte. Notre choix initial d'exprimer le récepteur soluble comme une protéine de fusion avec un polypeptide de six histidines en position N terminale se révéla être très efficace.

Les anticorps spécifiques dirigés contre le récepteur soluble se sont aussi révélés doués de propriétés inattendues et ont ouvert une nouvelle voie de recherche.

Enfin, nous avons pu tirer avantage des possibilités existantes à McMaster quant à la production d'adénovirus recombinants. Ce moyen d'administration d'un gène étranger chez l'animal est un outil exceptionnel que ce soit pour induire une réponse immunitaire ou au contraire pour provoquer une élévation transitoire mais soutenue d'une protéine spécifique. A l'inverse des animaux transgéniques, soumis à une anomalie de production d'une protéine dès leur stade embryonnaire et modifiant par la même leur statut général, les adénovirus suppléent parfaitement à la demi-vie très brève de la majorité des cytokines en induisant une sorte de "libération prolongée".

6. PREMIER ARTICLE

(Sous presse, "Journal of Interferon and Cytokine Research", 1996, Vol. 16, issue 11)

Les récepteurs pour l'interleukine-6 humaine puis murine ont été décrits et plusieurs équipes ont produit dans des cellules eucaryotes leurs homologues solubles, protéines ayant des activités "facilitantes" pour l'action de l'IL-6. Dans ce travail nous décrivons la synthèse du récepteur de l'IL-6 de rat dans *E. coli* et dans des cellules d'insectes. La partie du gène exprimée est légèrement différente puisque dans le premier cas nous avons opté pour une approche à l'aide d'enzyme de restriction ce qui nous a livré un fragment codant pour les 324 premiers amino-acides. Le baculovirus porte, lui, le gène codant pour les 358 premiers amino-acides du fait de l'utilisation de la PCR et d'amorces spécifiques. Dans les deux cas néanmoins, il s'agit d'une protéine de fusion avec en N-terminal six histidines. Ces résidus permettent une purification en une seule étape sur une colonne d'affinité chargée en nickel. Ces deux systèmes permettent la purification partielle d'une protéine de 34 kDa (*E. coli*) ou 47 kDa (baculovirus) biologiquement active. L'activité biologique a été vérifiée par une approche originale consistant à stimuler des cellules HepG2 avec de l'IL-6 de rat et le récepteur soluble produit, et de mesurer la production de protéines de la phase aiguë. Comme l'IL-6 de rat ne peut pas stimuler les cellules humaines (non reconnaissance inter-espèce), la production de protéines de la phase aiguë ne peut être que la résultante de l'action de l'IL-6 et du récepteur soluble sur les gp130 humaines présentes à la surface des cellules HepG2. Le récepteur soluble dérivé de *E. coli* ou baculovirus induit sur les cellules B9, dont la prolifération est dépendante de l'IL-6, non seulement un effet synergique avec l'IL-6 mais peuvent même induire une prolifération indépendante d'IL-6 exogène. Cet effet est totalement abrogé lorsque l'on répète l'expérience en présence d'anticorps anti-IL-6. Il semble donc que l'on ait à faire à une boucle autocrine induite par la présence de récepteurs solubles à une concentration importante et la sécrétion résiduelle d'IL-6 par les cellules murines.

Les deux systèmes d'expression utilisés produisent donc un récepteur soluble à l'IL-6 de rat, pur, biologiquement actif et dont les effets semblent identiques à ceux décrits pour les homologues humain et murin.

Characterization And Biological Activities Of Recombinant Rat Soluble Interleukin-6 Receptor.

VINCENT THIBAUT^{1,2}, BERNARD TERLAIN² AND JACK GAULDIE¹

¹Molecular Virology and Immunology Program, Department of Pathology, McMaster University, Hamilton, CANADA

²Laboratoire de pharmacologie et URA CNRS 1288, Faculté de Médecine - BP 184 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex, FRANCE

Running Title: Rat Soluble Interleukin-6 Receptor

Correspondence to: Dr. J. Gauldie, Department of Pathology, McMaster University, 1200 Main Street West, Hamilton, Ontario L8N 3Z5, CANADA

tel.: (905)-521 9100 ext. 6332

fax: (905)-577 0198

email: Gauldie@FHS.McMaster.CA

This work was supported by grants from MRC Canada and Rhone-Poulenc Rorer U.K.

ABSTRACT

The soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) consists of the extracellular domain of the membrane bound IL-6 receptor (gp80) found on many types of cells. Contrary to most other soluble cytokine receptors, it possesses *in vitro* agonistic properties, yet its physiologic role remains unknown. We have generated a cDNA encoding the rat sIL-6R and have expressed and purified the protein using *E. coli* and baculovirus systems. Analysis of purified protein by electrophoresis and silver staining showed a single band migrating at 35 kDa for *E. coli* (non-glycosylated) and 47 kDa for baculovirus derived material. The purified protein is biologically active as determined by the ability to convert human hepatoma cells (HepG2) from non-responsive to responsive to rat IL-6 and induce acute phase protein synthesis. Most important, we show that rat sIL-6R directly induces the proliferation of the IL-6 dependent murine hybridoma cell line (B9) in an IL-6 like manner with 50% proliferation induced by 100 ng/ml of baculovirus derived receptor protein. Moreover, physiologic concentrations of sIL-6R dramatically enhance the sensitivity of B9 cells to IL-6 indicating the bioassay for IL-6 is susceptible to modulation by the presence of sIL-6R in rodent serum samples. This sIL-6R dependent B9 cell proliferation is fully abrogated by antibodies directed against rodent IL-6 and indicates autocrine production of low amounts of IL-6 by the B9 cell line.

INTRODUCTION

Interleukin-6 is a cytokine involved in many physiologic responses occurring after challenge such as trauma, infection or exercise and these responses are aimed at protection from further tissue damage and restoration of normal homeostasis (1). Part of this process, occurring in the liver, is commonly described as the acute phase response and is regulated, in the main, by IL-6 and IL-6 like cytokines (2). Beside this primary defense process, IL-6 has been shown to be relevant during immunologic responses, hematopoiesis and many other physiologic processes (3).

The ubiquitous effects of IL-6 involve its interaction with at least two glycoproteins; gp80 described as the IL-6 transmembrane receptor (IL-6R) and gp130 known as the transducing protein (4). The first interaction consists of low affinity binding of IL-6 to IL-6R at the surface of the cell followed by the interaction of this complex with two molecules of gp130 in a high affinity interaction. Indeed, recent data suggest the formation of a hexameric complex of two molecules each of IL-6, IL-6R and gp130 on the surface of the cells (5, 6). The resulting homodimerization of gp130 and its subsequent phosphorylation triggers a cascade of cellular events involving several protein tyrosine kinases and phosphorylation of different proteins that have been only partially characterized (7). In the hepatocyte, this results in the rapid up-regulation of a series of acute phase protein genes.

A soluble counterpart of gp80, a 45-55 kDa glycoprotein, consisting of the extracellular domain of gp80, has been shown to be present in human serum (75-100 ng/ml), as well as in several other biological fluids such as urine, bronchoalveolar lavage fluid, cerebrospinal fluid and synovial fluid (8, 9). This soluble receptor is generated either by cleavage of the surface-bound receptor or produced by differential splicing at the mRNA level depending on the cell type (10-13). The serum level of sIL-6R is increased during infections such as HIV, chronic diseases such as monoclonal gammopathy or inflammatory bowel disease, but decreased (from <1.0 ng/ml to 42 ng/ml) in patients with sepsis syndrome or children with systemic juvenile rheumatoid arthritis (14-17). The serum concentration of murine sIL-6R is variable depending on the mouse strain (5-45 ng/ml) but has been shown to increase with age in MRL/l pr mice when auto-immune manifestations occur and during gestation in ICR mice (18, 19).

To be able to investigate the long-term role of the soluble IL-6R in vivo in a homologous system, we have generated truncated forms of the rat IL-6R cDNA and expressed them in two different systems. Purified sIL-6R associated with rat recombinant IL-6 induces the production of acute phase protein synthesis in human hepatoma cells whereas rat IL-6 alone cannot. Physiologic concentrations of recombinant rat soluble interleukin-6 receptor, without exogenous addition of IL-6, induces proliferation of the IL-6 dependent murine hybridoma cell line (B9). This effect is abrogated by antibodies directed against rat IL-6. IL-6 dependent proliferation of this cell line is also dramatically increased in the presence of physiologic concentrations of recombinant sIL-6R, suggesting caution in the interpretation of IL-6 serum levels in the presence of sIL-6R.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

HepG2, a human hepatoma cell line, was grown in (aMEM media supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin.

Sf9 cells were grown in complete Grace media 10% FCS (Gibco) and High Five cells (Trichoplusiani) [Invitrogen, San Diego, CA, USA] in Ex-Cell 400TM medium with L-Glutamine (JRH Biosciences, KS, USA) at 27°C.

B9 assay

B9 assay was conducted as previously described (20). Basically, 50 µl of B9 cells were washed three times in IL-6 free media, adjusted to a concentration of 50,000 cells/ml and added to 50 µl of sample containing different combinations of cytokine and receptor. After 72 hours of incubation at 37°C, proliferation was measured by adding the tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium [MTT] and incubated for a further 4 hours.

Stimulation of HepG2 cells and determination of acute phase proteins

HepG2 cells were grown in 24 well plates to subconfluency, media was removed and the stimulatory cytokines were added in 300 µl of fresh media containing 2% FCS. After three days of stimulation supernatants were collected and a1-antichymotrypsin content analyzed by immunoelectrophoresis as previously described (21).

Antibodies against rat recombinant IL-6

Rabbits were immunized with purified recombinant rat IL-6 expressed in *E. coli* (22). IgG was purified from serum on a protein A sepharose column (CL4B, Pharmacia). This antibody inhibits both rat and mouse IL-6 in the B9 hybridoma assay. Control IgG was purified from a non immunized rabbit.

Expression of sIL-6R in E. coli

The cDNA encoding rat IL-6R (gp80) was cloned into the multicloning site of pH6EX3 (BamHI-EcoRI), digested with XmaI at position 969 (According to sequence published by Baumann et al (23)) and religated (Fig 1B). This plasmid (pH6EX3-sIL-6R)

encodes for a fusion protein with N-terminus a hexahistidine residue (6-His) followed by a thrombin cleavage site (TCS) and the sIL-6R (AA 21-304) at its C-terminus. *E.coli* strain K5254 was transformed with pH6EX3-sIL-6R and the material recovered from inclusion bodies was purified using nickel chelate chromatography (Biorad™, 15 mm column). Eluted fractions (pH gradient) were renatured by stepwise dialysis in 1M urea, 0.05M Tris-Cl, 2 mM reduced glutathione (SIGMA), 0.02 mM oxidized glutathione (SIGMA), pH 8, and finally slowly dialyzed in phosphate buffered saline pH 7.2 at 4°C. Supernatants were run on SDS-PAGE and purity assessed by silver staining of the gel. Total amount of protein in each fraction was determined with the Biorad™ protein assay.

Expression of sIL-6R in baculovirus

Two primers were designed for pH6EX3-sIL-6R that span the 5' end of the region encoding the hexahistidine region [GTATCCATGGCCCCTATACATCAC] and the 3' end corresponding to the junction between the extracellular domain and the transmembrane domain of IL-6R [AGGCGGAATTCATTGCACTGGGGCI (the NcoI site and the EcoRI/Stop codon are underlined). A Polymerase Chain Reaction® derived a cDNA that was cloned into the NcoI/EcoRI sites of pAcGP67B plasmid (Fig. 1C) (Pharmingen) and co-transfected into *Sf9* insect cells with the linearized Baculogold DNA (Pharmingen™) according to the manufacturer's protocol. High Five insect cells were infected and serum free conditioning media (Ex-Cell 400™, JRH Biosciences) was collected. The supernatant was purified by nickel chelate chromatography and eluted fractions (imidazole gradient) were dialyzed against PBS, filter sterilized, run on SDS PAGE, and the gel was silver stained to assess for purity. Total amount of protein in each fraction was determined with the Biorad protein assay.

Chloramphenicol Acetyl-Transferase (CAT) assays

The portion (-95 to +47 base pairs) of the murine TIMP-1 gene cloned into pBLCAT3 indicator plasmid was kindly provided by Dylan R. Edwards (University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada) and transfected into HepG2 cells. Transfected cells were plated into 6-well tissue culture plates, serum starved for 6 hours in serum free (a-MEM media and stimulated with different cytokines for 18 hours. The supernatants were removed, cells were harvested

in 0.25 M Tris pH 7.5 and lysed by three cycles of freeze-thaw. CAT assays were carried out according to standard protocols (24) and ^{14}C labelled chloramphenicol products quantified using the ImageQuant® software (Molecular Dynamics).

RESULTS

Hexahistidine tagged recombinant protein: single step purification of E.coli or Baculovirus derived soluble IL-6R

Proteins expressed in either *E. coli* or baculovirus systems and bound to the Ni resin, either in native or denatured form, can be specifically eluted by decreasing the pH (protonation of the histidines) or increasing imidazole concentration (competition for the binding sites) (25-27).

E. coli derived material was incubated with the resin under denaturing conditions (5M Gu-Cl), packed into a column and after an extensive wash at pH 7.2, hexa-histidine tagged rat sIL-6R was specifically eluted by gradually lowering the pH and was found mostly in the pH 5.0 and 4.0 fractions. The use of a redox system (reduced/oxidized glutathione), low concentration of urea (1 M) and progressive dialysis were the key elements to generate properly refolded recombinant protein (28).

Purified rat sIL-6R (*E. coli*) migrated as a protein of 35kD after electrophoresis on a polyacrylamide gel (data not shown).

Baculovirus derived material (encompassing the entire extracellular domain - Fig. 1C) was applied to the chelate column under non-denaturing conditions and the recombinant sIL-6R, eluted mostly in fractions containing 50-200 mM imidazole, was over 95% pure as assessed by silver staining of the protein gel (data not shown). The protein migrated around 47 kDa, reflecting the addition of carbohydrate in the virus system and the yield as assessed by protein assay was 4 mg/l culture.

Bioactivity of purified recombinant sIL-6R: sIL-6R induces acute phase protein synthesis

Although the interspecies homology for IL-6 and IL-6R is relatively high, rat interleukin-6 is not able to bind to human interleukin-6 receptor with appreciable affinity and therefore cannot trigger any biological effect on human cells (23, 29). We have used this concept to check the biological activity of the recombinant material produced. A human hepatoma cell line (HepG2) produces acute phase proteins when stimulated with human cytokines like IL-6, IL-11, CNTF, Oncostatin-M or LIF (30-33).

We stimulated HepG2 cells with different cytokines: rat IL-6 alone, rat soluble IL-6R (baculovirus derived), human IL-6 or a combination of rat IL-6 plus rat soluble interleukin-6

receptor. Although the secretion of a1-anti-chymotrypsin by HepG2 cells was not stimulated by up to 2.5 µg/ml of rat IL-6 alone (data not shown), a combination of rat IL-6 plus rat sIL-6R allows for the stimulating effect of rat IL-6 on human cells. Concentration of sIL-6R from 1.3 to 5 µg/ml when associated with 200 ng/ml of rat IL-6 induced an increase of a1-anti-chymotrypsin secretion by HepG2 cells to up 175% (Fig.2a). The response induced by the combination of rIL-6 and rsIL-6R was dependent on the concentration of each protein. The best response was induced by 200 ng/ml of rat IL-6 with 6 µg/ml of rat sIL-6R (Fig. 2b).

E. coli derived sIL-6R induced the same kind of response but with a lesser intensity (about 50%, data not shown).

It is noteworthy that the complex of rat IL-6/rat sIL-6R was able to trigger an HepG2 response but never reach the same stimulatory effect as human IL-6.

The complex of rIL-6/rsIL-6R triggers the same IL-6 response element as hIL-6

In order to examine whether a combination of rat IL-6 and rat sIL-6R would trigger the same response element on acute phase response genes as does human IL-6, we used HepG2 cells transfected with a reporter gene (pBLCAT3) downstream of the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) promoter (-90/+47). TIMP has been shown to be regulated by human IL-6 and Oncostatin-M in HepG2 cells (34). These transfected cells were stimulated with rat IL-6, rat sIL-6R, human IL-6 or a combination of rat IL-6/rat sIL-6R. Although rat IL-6 or rat sIL-6R alone could not induce CAT activity, the combination of rat IL-6 and rat sIL-6R was able to stimulate the cells similar to human IL-6 (Fig. 3).

sIL-6R potentiates IL-6 dependent B9 cell proliferation

B9 cells, a murine hybridoma cell line, is an IL-6 dependent cell line whose proliferation is IL-6 dose dependent. We looked at the effect of recombinant rat sIL-6R on IL-6 induced proliferation. Two different concentrations of sIL-6R were added to serial dilutions of rat IL-6. Recombinant proteins derived from both expression systems induced a dramatic increase in IL-6 dependent proliferation of B9 cells (Fig. 4). We compared the potentiating effect of rat sIL-6R with IU of rat IL-6 and found an average increase of proliferation of 1.65 and 1.25 fold with 500 and 50 ng/ml of baculovirus sIL-6R respectively, and of 1.8 and 1.3 fold with 2.5 µg/ml and 1 µg/ml of *E. coli* derived protein respectively.

This potentiating effect is therefore sIL-6R dose dependent and is more pronounced with baculovirus than with *E. coli* expressed protein.

sIL-6R is able to induce B9 cell proliferation

We looked at the effect of rat sIL-6R alone on B9 cell proliferation. Different concentrations of sIL-6R were added to B9 cells in the absence of exogenously added IL-6 (Fig. 5). Surprisingly, we observed a dose dependent proliferation induced with as low as 50 ng/ml of baculovirus expressed protein or 120 ng/ml of *E. coli* derived material. Increasing concentration of sIL-6R could reproduce a dose response curve similar to that seen with recombinant rat IL-6.

Effect of sIL-6R on B9 cell proliferation is entirely IL-6 dependent

The unexpected induction of B9 cell proliferation by recombinant sIL-6R alone, without addition of exogenous IL-6 was further investigated and rat IL-6 or rat sIL-6R induced proliferation was performed in presence of antibodies against rat IL-6 known to inhibit both rat and mouse IL-6 (22). B9 cells were grown in the presence of increasing concentrations of baculovirus expressed rat sIL-6R or *E. coli* expressed rat IL-6 as well as 1:100 dilution of purified IgG (4 mg/ml) from rabbits either immunized against rat IL-6 or control IgG (Fig. 6). IL-6 or sIL-6R induced B9 proliferation was not affected by the non relevant IgG, but the specific antibodies against rat IL-6 abrogated most of the response induced by rat IL-6 or rat sIL-6R. Effect of sIL-6R on B9 cell proliferation was therefore entirely dependent on the presence of IL-6 in the media coming most likely from the B9 cells themselves or possibly from the 5% fetal calf serum added to the media.

DISCUSSION

Soluble forms of cytokine receptors have been described for other interleukins including IL-1, IL-2, IL-4 and IL-7 and their roles are not yet completely understood. In many cases, soluble receptors are believed to act as antagonists owing to their ability to bind circulating ligand and therefore prevent them interacting with surface bound receptors. In the case of IL-6, naturally occurring or genetically engineered sIL-6R (i.e., the extra cellular domain of gp80) have been shown *in vitro* to act as agonists by interacting first with IL-6, this complex IL-6/sIL-6R being then able to bind gp130 and trigger the intracellular signal; the intracytoplasmic portion of the gp80 molecule is therefore not necessary for triggering the signal (35,36).

Although this protein has been shown to be present at high concentration in different species and biologically active *in vitro*, its role *in vivo* remains to be defined. The ubiquitous presence of gp130 on cell surfaces would make a perfect target for circulating IL-6/sIL-6R complexes that could, according to what has been found *in vitro*, induce a biological effect. This raises the question of a regulatory mechanism for any IL-6 mediated effect. We decided to investigate the role of sIL-6R in chronic rat models and needed to produce fully homologous reagents to avoid immune reactivity.

In this paper, we have purified rat soluble IL-6 receptor from two different expression systems: *E. coli* and baculovirus. The first system proved more efficient and easier to use but we found baculovirus a more powerful system. Owing to the lack of available antibodies and tools to purify the rat soluble interleukin-6 receptor, we opted for a molecular approach to tag the protein of interest with a hexa-histidine peptide and use Ni chelate affinity chromatography to purify it to a reasonably pure protein as shown by a single major band on a silver stained electrophoresis gel. We encountered major difficulties to resolubilize *E. coli* derived protein after recovery from the inclusion bodies and only very gradual dialysis in a buffer containing a redox system and a low concentration of urea overcame partially the precipitation process.

Our problems with refolding of the protein could be partially explained by the presence of 11 cysteinyl residues in the extra-cellular domain and therefore formation of undesirable disulfide bridges. These difficulties and the use of a specific refolding strategy were also reported by Stoyan et al in purifying human sIL-6R expressed in *E. coli* (37). By

comparison, when we expressed and purified rat IL-6, which contains only 5 cysteinyl residues and no N-glycosylation site, under the same conditions it did not pose any particular problem and only a small amount of protein precipitated (22,38).

Purified protein from *E. coli* migrated around 35 kDa which was the predicted molecular weight since no post-translational modification occurs in bacteria. The protein obtained from baculovirus, with a size around 47 kDa, confirms what has been found by others with murine sIL-6R cDNA in mammalian expression systems (39) and recently described for human sIL-6R (40). Our yield of 4 mg/l rat sIL-6R compares favourably with that found for human sIL-6R (5 mg/l) (40).

The *in vitro* effects of human sIL-6R as well as murine sIL-6R have been described on different systems such as MI cells, homologous hepatocytes (41,42), human breast carcinoma cells (36), leukemic B lymphocytes (43), embryonic stem cells (44) and osteoblasts (45). Van Snick and Baumann have previously described the inability of murine IL-6 to stimulate acute phase proteins synthesis in human hepatoma cells, such as HepG2 (23,29) and we have extended this finding for rat IL-6 which shares a high homology with its murine counterpart. Stimulation of HepG2 cells with a concentration of up to 1 mg/ml of rat IL-6 did not induce any acute phase protein synthesis. Addition of rat sIL-6R to rat IL-6 in this system gave the ability to HepG2 cells to respond to rat IL-6. This situation is very similar to what has been described by Baumann et al (23) where HepG2 cells were transfected with rat IL-6R (gp80) cDNA and Fiorillo et al who transfected mutants of murine IL-6R into Hep3B cells (39). Indeed, they both found a stimulatory effect of the rodent cytokine on the transfected human cell. The specificity of interaction of IL-6 for IL-6R seems more restricted than that between IL-6/IL-6R complex and gp130 across the species.

The minimal concentration to detect an effect on HepG2 cells, in the presence of 200 ng/ml of rat IL-6, of 1 µg/ml of rat sIL-6R, which is well above the concentration reported in the circulation, and the inability to stimulate HepG2 cell gene expression to the same level as seen with 100 ng/ml of human IL-6 indicates clearly a certain inefficiency in the interaction of rat IL-6/sIL-6R complex with human gp130. Yet, those concentrations are in the range of what has been found by others in fully homologous systems. Novick et al used 600 ng/ml of human sIL-6R in presence of human IL-6 to inhibit human breast carcinoma cell growth (36) and Saito et al used between 1.1 to 3.3 µg/ml of murine sIL-6R to enhance the IL-6-induced

growth inhibition of murine MI cells (46). Comparisons are made difficult in the case of HepG2 cells, since Mackiewicz used unique units to quantify the amount of human sIL-6R used in their experiments (42).

We performed similar assays on H35 cells, a rat hepatoma cell line that we stimulated with different IL-6/sIL-6R combinations and determined cysteine proteinase inhibitor (CPI) production. We did not find an effect of rat sIL-6R by itself but could detect a slight enhancing action of the rat sIL-6R on rat IL-6 induced acute phase protein production (data not shown). We have previously shown that hepatocytes are not primary sources of IL-6 *in vivo* (47).

In order to be active a complex of IL-6/sIL-6R has to interact with a free gp130 molecule on the surface of the cell; therefore, the absence of a clear synergistic effect of sIL-6R on H35 cells could reflect a ratio gp80/gp130 above or close to one; indeed when one adds a mixture of IL-6 and sIL-6R to H35 hepatoma cells, IL-6 binds to either sIL-6R or gp80 on the cell surface but the number of gp130 could be the limiting factor. This problem does not appear on human HepG2 cells since the only possible interacting molecule for rat IL-6 is the rat sIL-6R, and this likely explains the higher sensitivity of this system. Although hepatoma cells could not be considered, *per se*, as normal cells, our findings raise the question about an *in vivo* effect of sIL-6R on acute phase protein synthesis. Since IL-6 shares its transducer protein gp130 with other members of the IL-6-like cytokine family we are facing a complex problem involving not only the ratio gp130/gp80 at the cell surface but also the amount of circulating LIF, OM, IL11 and their specific receptors and soluble receptors if any. Therefore, extrapolation to an *in vivo* situation remains still highly speculative.

The B9 murine hybridoma cell line is known to be highly specific for IL-6, although some reports seem to indicate that high concentration of IL-6-like cytokines could interfere with IL-6-induced proliferation (48,49) and that certain B9 subclones could be more responsive to IL-11 (50). In our study, B9 cells were shown to be very sensitive to exposure to rat sIL-6R. Both *E. coli* and baculovirus derived proteins were highly active on B9 cells although the former to a lesser extent, indicating the interaction was independent of glycosylation. Concentrations as low as 50 ng/ml of rat sIL-6R induced proliferation of B9 cells even without the presence of exogenous IL-6. The proliferation induced by the soluble receptor was similar to that induced by IL-6 with a tendency to plateau at high sIL-6R

concentrations. By comparison, IL-6 remains much more potent in this stimulatory effect with 50% proliferation induced with 0.45 pg, whereas 10 ng of sIL-6R was necessary to trigger the same effect. Those concentrations are in the same range as those reported by Diamant et al who found similar effects of human sIL-6R on B9 cells at concentrations varying from 25 to 100 ng/ml (51). In contrast, Frieling et al did not report any activity of human sIL-6R either alone or in combination with human IL-6 on B9 cells (8). This sIL-6R induced proliferation effect was unexpected since in all the other systems described so far, the presence of IL-6 was necessary at the same time as sIL-6R to observe an effect. (14,18,35,39,42,45,52).

Indeed, the explanation for an independent effect of rat sIL-6R on B9 cells was ruled out by our experiment with specific antibodies against rat IL-6 which recognize murine IL-6. Pre-incubation of rat sIL-6R or rat IL-6 with IL-6 specific antibodies abrogated totally the proliferative effect of those two molecules, indicating clearly an IL-6 dependent effect of the rat sIL-6R. Since we extensively washed the cells prior to the assay and did not add any IL-6 exogenously, IL-6 was either present in the media when the assay was started, possibly through the fetal calf serum, or was directly produced by B9 cells during the assay in an autocrine fashion. The former hypothesis is unlikely since our antibodies have been raised against rat IL-6 and are not likely to recognize the bovine cytokine and also since increasing concentration of FCS (up to 50%) did not change the rat sIL-6R induced proliferation (data not shown). It is highly probable that B9 cells secrete low amounts of murine IL-6, and this effect is enhanced by the presence of sIL-6R. The high homology (93%, (38)) between rat and murine IL-6 would explain mIL-6 interaction with rat sIL-6R and its recognition by anti-rat IL-6 antibodies. As they mentioned, Diamant et al could not totally abrogate the proliferative effect of human sIL-6R on B9 cells probably because of the specificity of their antibody for human IL-6 and therefore may not recognize mIL-6 secreted by the B9 cells (51).

We further investigated the effect of a combination of rat IL-6 and rat sIL-6R on B9 cell proliferation and found an enhancing effect of rat sIL-6R. In presence of rat sIL-6R the dose-response curve is shifted toward low IL-6 concentrations and the enhancing effect is especially seen at low IL-6 levels. At the lowest rat sIL-6R concentration tested (50 ng/ml) IL-6 induced proliferation could be increased by a factor of up to 6.4 depending on IL-6

concentration. This concentration is in the range of what has been described in mouse or human circulation and thus the presence of sIL-6R in fluids could possibly interfere with IL-6 determinations using the B9 assay (8, 14, 16, 18).

Throughout our experiments we found similar results using *E. coli* or baculovirus derived sIL-6R even though the bacteria derived protein was never as potent as baculovirus sIL-6R. Several explanations could account for this effect. In this bacterial expression system, we had to go through a denaturation/renaturation step during the purification; the purified material, even though free of precipitate, is not necessarily in its native conformation and we cannot assess the ratio of properly to improperly (but soluble) refolded protein and therefore may overestimate the concentration of biologically active protein. Second, our direct approach (restriction enzyme digestion) to generate the cDNA encoding the extracellular domain gives us a truncated form of 304 amino-acids as compared to the entire extracellular domain of 338AA which we used in our PCR approach for the baculovirus expression system; we do not think this will explain the discrepancy between the biological activity of the two proteins especially since Taga et al initially used an even shorter fragment of 302 AA and noticed biological activity (35).

In conclusion, biologically active hexa-histidine tagged recombinant rat sIL-6R can be efficiently produced and purified with simple methods in a bacterial or insect cell expression system. The activity of this soluble receptor from rat on human acute phase protein synthesis in HepG2 cells confirms what has been described previously with the human and murine molecules. Interference of sIL-6R should be taken into consideration when determining IL-6 concentrations in rodents as well as humans with the B9 assay. Generation of antibodies against this protein should provide information about the circulating level of sIL-6R in rat and help to define its precise biological role.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Chong and J.A. Schroeder for technical assistance, Dr. C. Langdon who helped with the CAT assays, Dr. J.M. Sallenave for his advice and constant interest and Dr. C. D. Richards for helpful discussions. This work was supported by grants from MRC Canada and Rhone-Poulenc Rorer U.K.

Address reprint requests to:

Dr. J. Gauldie
Department of Pathology
McMaster University
1200 Main Street West
Hamilton, ON L8N 3Z5
Canada

REFERENCES

1. XING, Z., RICHARDS, C.D., BRACIAK, T. and GAULDIE, J. (1995). Cytokine regulation of hepatic acute phase protein expression. In *Cytokines and the liver, Falk symposium 78*. W. Gerok, K. Decker, T. Andus, and V. Gross, eds. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, p. 164-171.
2. BAUMANN, H. and GAULDIE, J. (1994). The acute phase response. *Immunol. Today* **15**, 74-80.
3. HIRANO, T., AKIRA, S., TAGA, T. and KISHIMOTO, T. (1990). Biological and clinical aspects of interleukin 6 *Immunol. Today* **11**, 443-449.
4. HIRANO, T., MATSUDA, T. and NAKAJIMA, K. (1994). Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells* **12**, 262-77.
5. WARD, L.D., HOWLETT, G.J., DISCOLO, G., YASUKAWA, K., HAMMACHER, A., MORITZ, A.L. and SIMPSON, R.J. (1994). High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J. Biol. Chem.* **269**, 23286-23289.
6. PAONESSA, G., GRAZIANI, R., DESERIO, A., SAVINO, R., CIAPPONI, L., LAHM, A., SALVATI, A.L., TONIATTI, C. and CILIBERTO, G. (1995). Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp130 dimer formation and signalling. *Embo J* **14**, 1942-1951.
7. KISHIMOTO, T., TAGA, T. and AKIRA, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell* **76**, 253-62.
8. FRIELING, J.T., SAUERWEIN, R.W., WIJDENES, J., HENDRIKS, T. and VAN DER LINDEN, C.J. (1994). Soluble interleukin 6 receptor in biological fluids from human origin. *Cytokine* **6**, 376-381.
9. YOKOYAMA, A., KOHNO, N., HIRASAWA, Y., KONDO, K., ABE, M., LNOUE, Y., FUJIOKA, S. FUJINO, S. ISHIDA, S. and HIWADA, K. (1995). Evaluation of soluble IL-6 receptor concentration in serum and epithelial lining fluid from patients with interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* **100**, 325-329.

10. MULLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., GUNTHER, M., GRAEVE, L., BUSE, G., MACKIEWICZ, A., HEINRICH, P.C. and ROSE-JOHN, S. (1993). The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* **23**, 473-480.
11. LUST, J.A., DONOVAN, K.A., KLINE, M.P., GREIPP, P.R., KYLE, R.A. and MAIHLE, N.J. (1992). Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* **4**, 96-100.
12. HORIUCHI, S., KOYANAGI, Y., ZHOU, Y., MIYAMOTO, H., TANAKA, Y., WAKI, M., MATSUMOTO, A., YAMAMOTO, M. and YAMAMOTO, N. (1994). Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1945-1948.
13. KORHOLZ, D., NUSSBAUM, P., PAFFERATH, B., MAUZ-KORHOLZ, C., HEMPEL, L. and BURDACH, S. (1994). Activation of protein kinase C induces de novo synthesis of the soluble interleukin-6 receptor in human B cells. *Scand. J. Immunol.* **40**, 515-520.
14. HONDA, M., YAMAMOTO, S., CHENG, M., YASUKAWA, K., SUZUKI, H., SAITO, T., OSUGI, Y., TOKUNAGA, T. and KISHIMOTO, T. (1992). Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J. Immunol.* **148**, 2175-2180.
15. FRIELING, J.T.M., VANDEUREN, M., WIJDENES, J., VANDERMEER, J.W.M., CLEMENT, C., VANDERLINDEN, C.J. and SAUERWEIN, R.W. (1995). Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. *J. Infect. Dis.* **171**, 469-472.
16. DE BENEDETTI, F., MASSA, M., PIGNATTI, P., ALBANI, S., NOVICK, D. and MARTINI, A. (1994). Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **93**, 2114-2119.
17. GAILLARD, J.P., BATAILLE, R., BRAILLY, H., ZUBER, C., YASUKAWA, K., ATTAL, M., MARUO, N., TAGA, T., KISHIMOTO, T. and KLEIN, B. (1993). Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur. J. Immunol.* **23**, 820-824.
18. SUZUKI, H., YASUKAWA, K., SAITO, T., NARAZAKI, M., HASEGAWA, A., TAGA, T. and KISHIMOTO, T. (1993) Serum soluble interleukin-6 receptor in MRL/1 pr

- mice is elevated with age and mediates the interleukin-6 signal. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1078-1082.
19. MAEDA, T., YAMAGUCHI, M., TAGA, T., KISHIMOTO, T., WADA, K., IKEGAMI, H., KURACHI, H. and MIYAKE, A. (1994). Decidua is a possible source of serum mouse soluble interleukin-6 receptor (msIL-6R): gestational profile of serum msIL-6R concentration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 998-1003.
20. RICHARDS, C., GAULDIE, J. and BAUMAN, H. (1991). Cytokine control of acute phase protein expression. *Eur. Cytokine Net.* **2**, 89-98.
21. GEISTERFER, M., RICHARDS, C., BAUMANN, M., FEY, G., GWYNNE, D. and GAULDIE, J. (1993). Regulation of IL-6 and the hepatic IL-6 receptor in acute inflammation *in vivo*. *Cytokine* **5**, 1-7.
22. BRACIAK, T.A., NORTHEMANN, W., CHONG, D.K., SCHROEDER, J.-A., and GAULDIE, J. (1996). Vector-derived expression of recombinant rat interleukin-6. *Protein Expression & Purification* **7**, 269-274.
23. BAUMANN, M., BAUMANN, H. and FEY, G.H. (1990). Molecular cloning, characterization and functional expression of the rat liver interleukin 6 receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 19853-19862.
24. SAMBROOK, FRITSCH, and MANIATIS. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
25. HOCHULI, E., DOBELI, H. and SCHACHER, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromato.* **411**, 177-84.
26. SCHMITT, J., HESS, H. and STUNNENBERG, H.G. (1993). Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Reports* **18**, 223-230.
27. HOCHULI, E., BANNWARTH, W., DÖBELI, H., GENTZ, R. and STÜBER, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *BiolTechnology* **6**, 1321-1325.
28. JAENICKE, R. and RUDOLPH, R. (1990) *Protein Structure - a practical approach*. IRL Press, New York.
29. VAN SNICK, J. (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 253-78.

30. SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., ROEB, E., HEINRICH, P.C. and ROSE-JOHN, S. (1992). Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. *FEBS Letters* **314**, 280-284.
31. BAUMANN, H. and SCHENDEL, P. (1991). Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. *J. Biol. Chem.* **266**, 20424-20427.
32. PIQUET-PELLORCE, C., GREY, L., MEREAU, A. and HEATH, J.K. (1994). Are LIF and related cytokines functionally equivalent? *Exp. Cell Res.* **213**, 340-347.
33. RICHARDS, C.D., BROWN, T.J., SHOYAB, M., BAUMANN, H. and GAULDIE, J. (1992). Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J. Immunol.* **148**, 1731-1736.
34. RICHARDS, C.D., SHOYAB, M., BROWN, T.J. and GAULDIE, J. (1993). Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin Min fibroblasts in culture. *J. Immunol.* **150**, 5596-5603.
35. TAGA, T., HIBI, M., HIRATA, Y., YAMASAKI, K., YASUKAWA, K., MATSUDA, T., HIRANO, T. and KISHIMOTO, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**, 573-581.
36. NOVICK, D., SHULMAN, L.M., CHEN, L. and REVEL, R. (1992). Enhancement of interleukin 6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibody. *Cytokine* **4**, 6-11.
37. STOYAN, T., MICHAELIS, U., SCHOOLTINK, H., VAN DAM, M., RUDOLPH, R., HEINRICH, P.C. and ROSE-JOHN, S. (1993). Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in *Escherichia coli*, renaturation and purification. *Eur. J. Biochem.* **216**, 239-245.
38. NORTHEMANN, W., BRACIAK, T.A., HATTORI, M., LEE, F. and FEY, G.H. (1989). Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 16072-16082.
39. SAITO, T., YASUKAWA, K., SUZUKI, H., FUTATSUGI, K., FUKUNAGA, T., YOKONIIZO, C., KOISHIHARA, Y., FUKUI, H., OHSUGI, Y., YAWATA, H. and et al. (1991). Preparation of soluble murine IL-6 receptor and anti-murine IL-6 receptor antibodies. *J. Immunol.* **147**, 16873.

40. WEIERGRABER, O., HEMMANN, U., KUSTER, A., MULLER-NEUEN, G., SCHNEIDER, J., ROSE-JOHN, S., KURSCHAT, P., BRAKENHOFF, J.P., HART, M.H., STABEL, S. et al. (1995). Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **234**, 661-669.
41. FIORILLO, M.T., TONIATTI, C., VAN SNICK, J. and CILIBERTO, G. (1992). Expression of the murine interleukin 6 receptor in hepatoma cells: the intracytoplasmic domain is not required for interleukin 6 signal transduction. *Eur. J. Immunol.* **22**, 799-804.
42. MACKIEWICZ, A., SCHOOLTINK, H., HEINRICH, P.C. and ROSE-JOHN, S. (1992). Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J. Immunol.* **149**, 2021-2027.
43. ADERKA, D., MAOR, Y., NOVICK, D., ENGELMANN, H., KAHN, Y., LEVO, Y., WALLACH, D. and REVEL, M. (1993). Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-alpha or -beta. *Blood* **81**, 2076-84.
44. NICHOLS, J., CHAMBERS, I. and SMITH, A. (1994). Derivation of germline competent embryonic stem cells with a combination of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor. *Exp. Cell Res.* **215**, 237-239.
45. TAMURA, T., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., MIYAURA, C., TANAKA, S., YAMADA, Y., KOISHIHARA, Y., OHSUGI, Y., KUMAKI, K., TAGA, T. and et al. (1993). Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11924-11928.
46. SAITO, T., TAGA, T., MIKI, D., FUTATSUGI, K., YAWATA, H., KISHIMOTO, T. and YASUKAWA, K. (1993). Preparation of monoclonal antibodies against the IL-6 signal transducer, gp130, that can inhibit IL-6-mediated functions. *J. Immunol. Meth.* **163**, 217-223.
47. GAULDIE, J., NORTHEMANN, W. and FEY, G.H. (1990). IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6. *J. Immunol.* **144**, 3804-3808.
48. BARTON, B.E., JACKSON, J.V., LEE, F. and WAGNER, J. (1994). Oncostatin M stimulates proliferation in B9 hybridoma cells: potential role of oncostatin M in plasmacytoma development. *Cytokine* **6**, 147-153.

49. BURGER, R. and GRAMATZKI, M. (1993). Responsiveness of the interleukin (IL)-6-dependent cell line B9 to IL-11. *J. Immunol. Meth.* **158**, 147-148.
50. LU, Z.Y., ZHANG, X.G., GU, Z.J., YASUKAWA, K., AMIOT, M., ETRILLARD, M., BATAILLE, R. and KLEIN, B. (1994). A highly sensitive quantitative bioassay for human interleukin- 11. *J. Immunol. Meth.* **173**, 19-26.
51. 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. Meth.* **173**, 229-35.
52. HOOPER, W.C., PHILLIPS, D.J., RIBEIRO, M., BENSON, J. and EVATT, B.L. (1995). IL-6 upregulates protein S expression in the HepG-2 hepatoma cells. *Thromb Haemost* **73**, 819-824.

Fig. 1. Construction of rat soluble interleukin-6 receptor expression systems for *E. coli* and baculovirus.

E. coli IL-6R cDNA after ligation into pH6EX3 (A) was digested with XmaI. the resulting construct encodes for the first 304 amino acids of rat gp80, with a thrombin cleavage site (TCS) and a hexahistidine peptide at its N-terminus (6-His) (B).

Baculovirus: two oligonucleotides (black arrows) were designed that spanned the 5' and the 3' end of the cDNA encoding the extracellular domain of rIL-6R with a hexahistidine at the 5' end. The resulting PCR product was ligated into pAcGP67 (C).

Fig. 2. Baculovirus expressed rat sIL-6R confers responsiveness of HepG2 cells to rat IL-6

A: HepG2 cells in 24 well plates were stimulated for 2 days with rat IL-6 (rIL-6), rat sIL-6R (rsIL-6R), human IL-6 (hIL-6) or a combination of rIL-6 and increasing concentration of rsIL-6R in 300 µl of media containing 2% FCS. α1-Antichymotrypsin (α1-ACT) concentration was measured in the supernatant of each well. 100% is defined as the amount of α1-antichymotrypsin produced by unstimulated cells. Result of one out of three representative experiments, each sample were done in triplicate; data are shown as mean +/- standard deviation.

B: same as fig. 3A but increasing concentration of rat IL-6.

Fig. 3: Baculovirus derived rat sIL-6R combined with rat IL-6 triggers the same acute phase response element as human IL-6.

HepG2 cells, transfected with a CAT reporter gene under the control of TIMP-1 promoter (-90/+47) base pairs), were stimulated in 1 ml of media with different combinations of cytokines for 18 hours. Cells were lysed and assayed for CAT activity. Result of one out of two representative experiments is shown. A: Percent conversion of chloramphenicol, calculated from the autoradiogram (B), as the counts of acetylated forms divided by the sum of acetylated and unacetylated forms. C: determination by immuno-rockets of α1-antichymotrypsin concentration in supernatants of HepG2 cells stimulated under the same conditions as in A.

Fig. 4: Rat sIL-6R enhances IL-6 induced B9 cell proliferation.

A: B9 cell proliferation was induced either with rat IL-6 alone (filled square) or a combination of rat IL-6 and 250 ng (open triangle) or 100 ng (open circle) of *E. coli* derived rat sIL-6R. Results are shown as mean +/- standard deviation of three separate experiments done in triplicate.

B: B9 cell proliferation was induced either with rat IL-6 alone (filled square) or a combination of rat IL-6 and 50 ng (open triangle) or 5 ng (open circle) of baculovirus rat sIL06R. Results are shown as mean +/- standard deviation of three separate experiments done in triplicate.

Fig. 5: Recombinant rat soluble interleukin-6 receptor induced B9 cell proliferation.

Assay was conducted as described in “materials and methods”. B9 cell proliferation was induced in the sole presence of either rat IL-6 (filled square) or *E. coli* derived (open triangle) or baculovirus derived (open circle) rat sIL-6R. Results are shown as mean +/- standard deviation of one out of three independent experiments.

Fig. 6: Antibodies directed against rat IL-6 abrogate rat sIL-6R induced B9 cell proliferation.

B9 cell proliferation was induced by rat IL-6 pre-incubated with either control IgG (from a non-immunized rabbit) (open square) or IgG from a rabbit immunized with rat IL-6 (filled square), or rat sIL-6R pre-incubated with either control IgG (open circle) or anti-rat IL-6 IgG (filled circle).

Figure 1

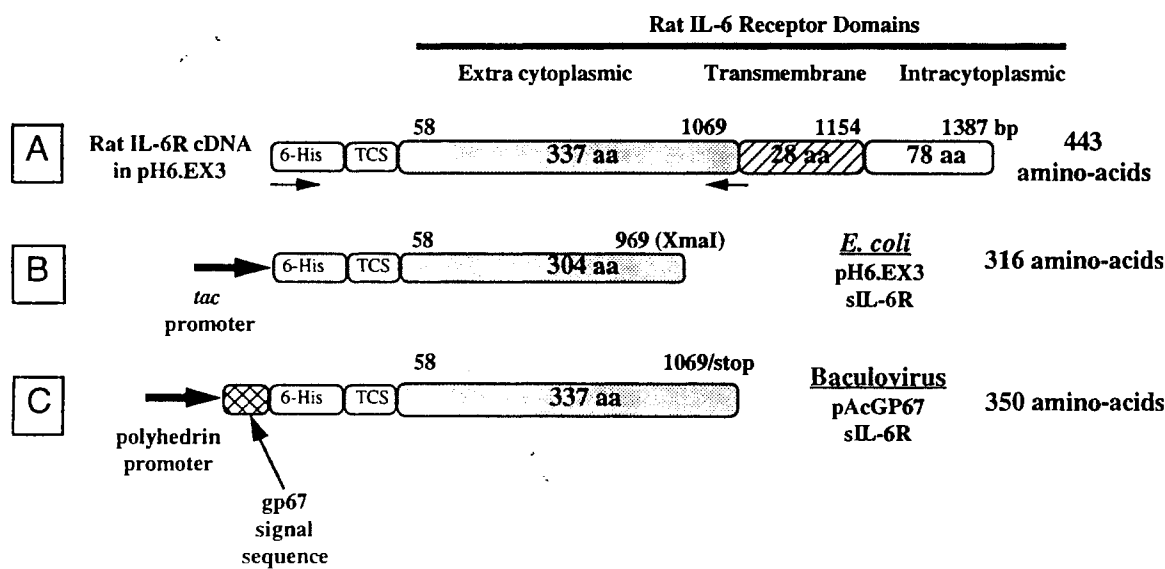


Figure 2A

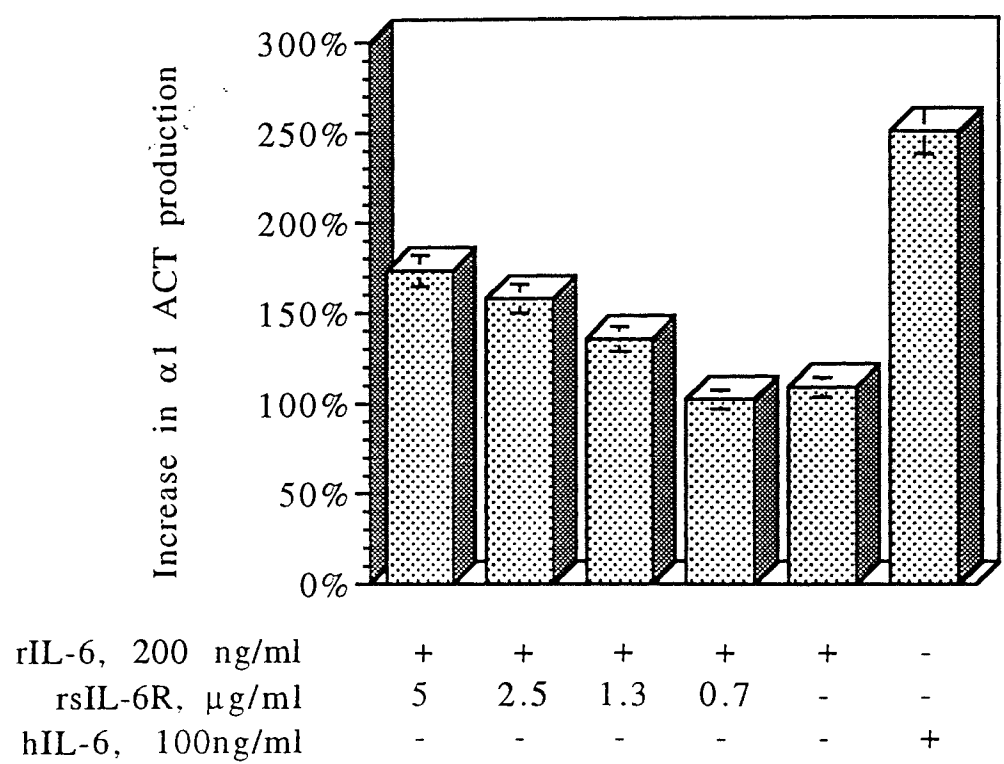


Figure 2B

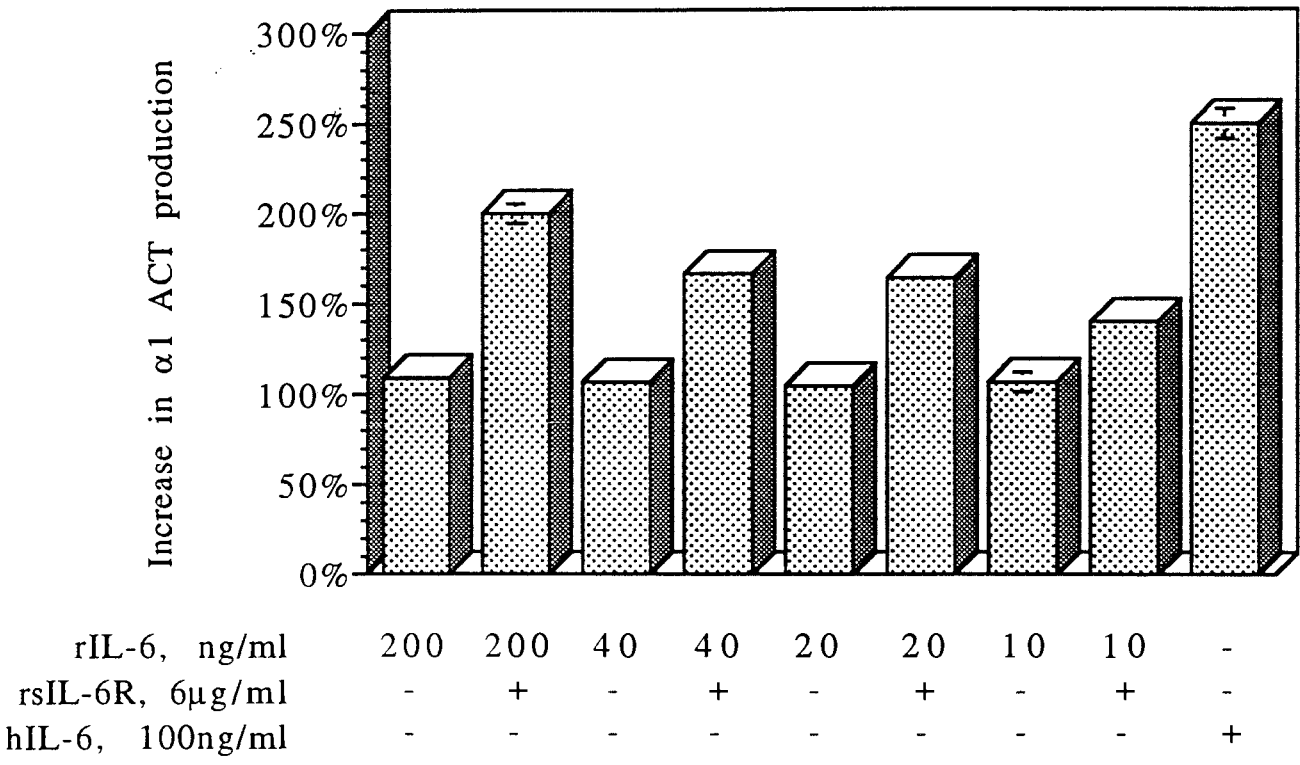


Figure 3

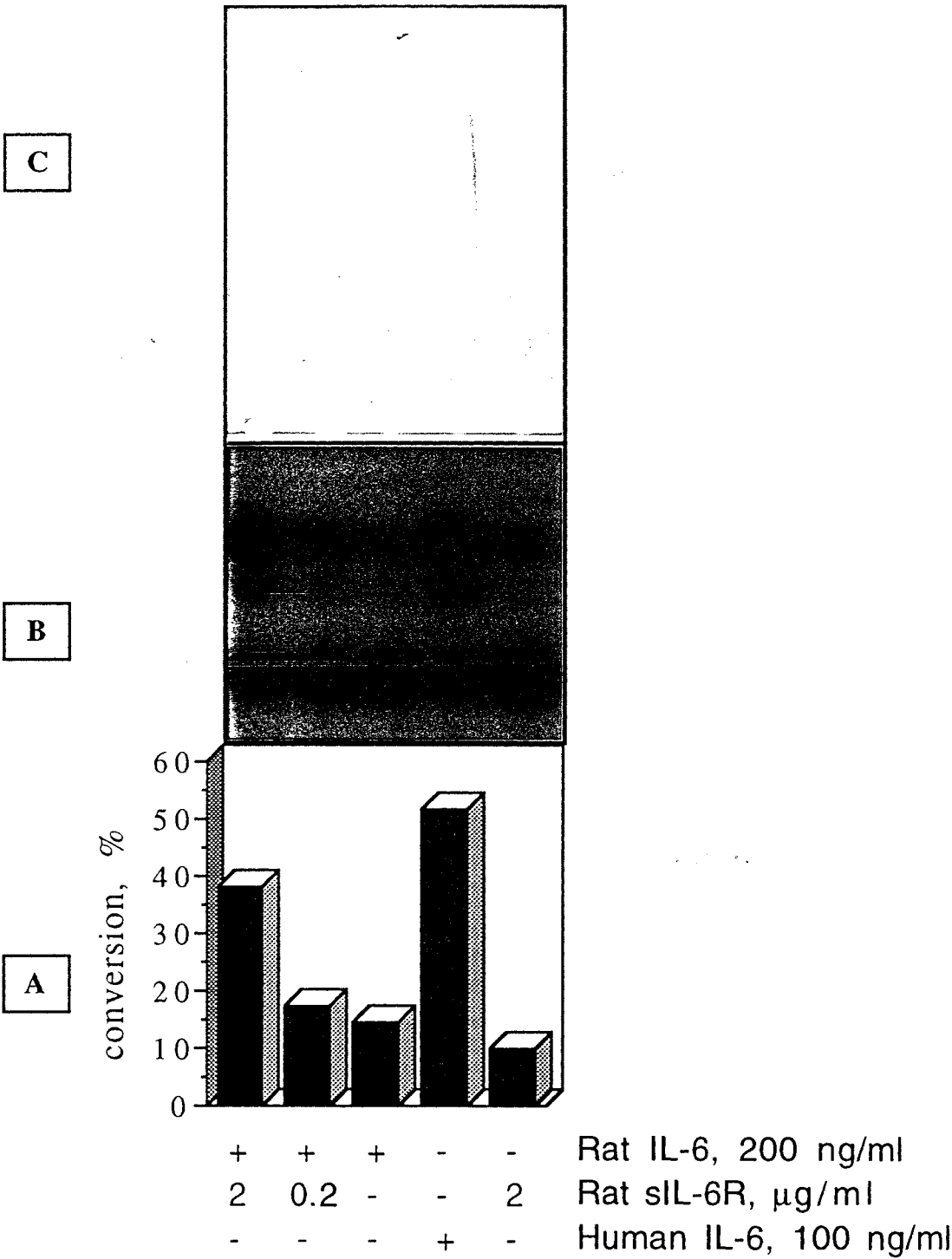


Figure 4A

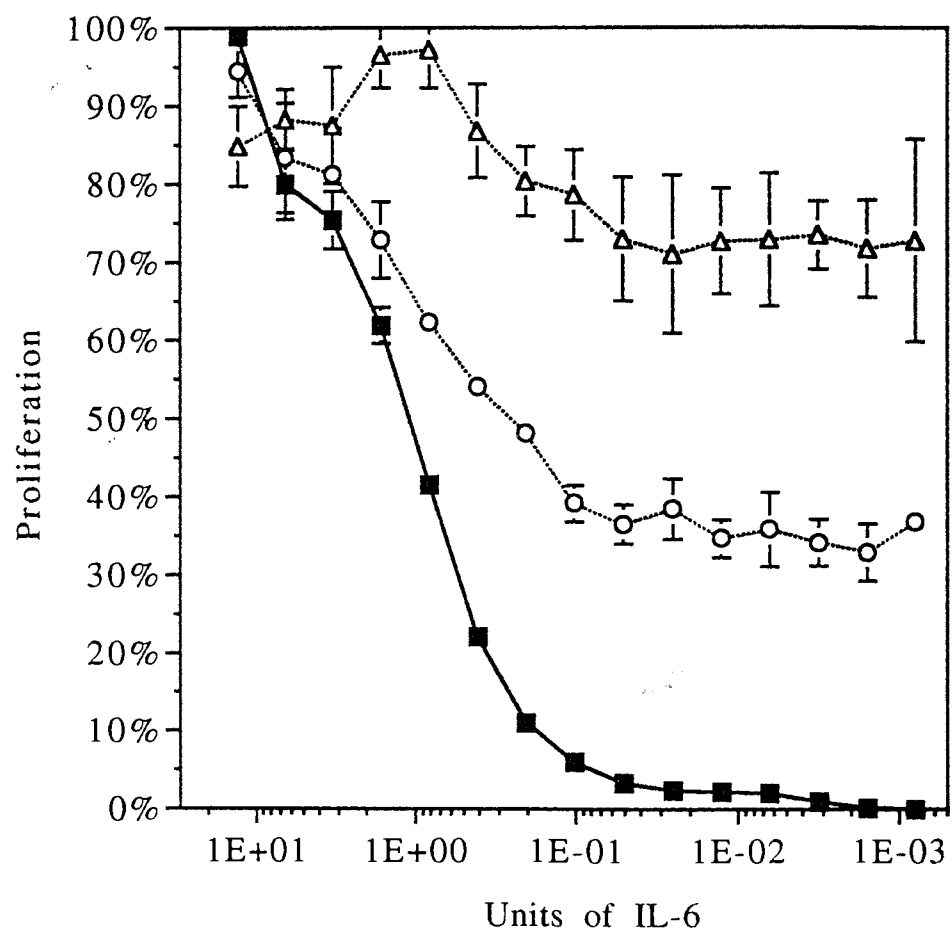


Figure 4B

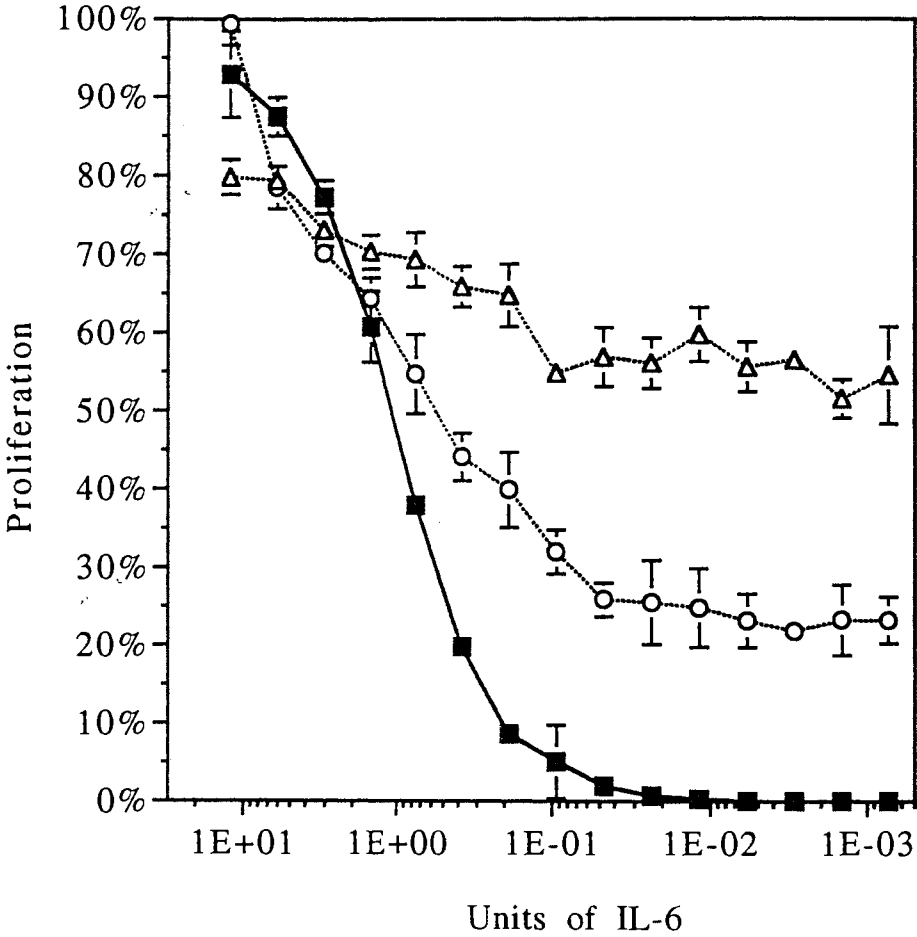


Figure 5

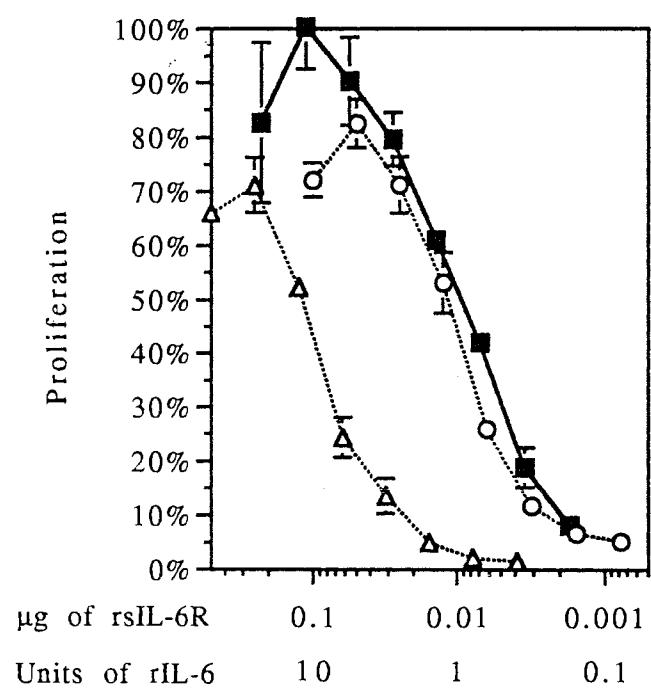
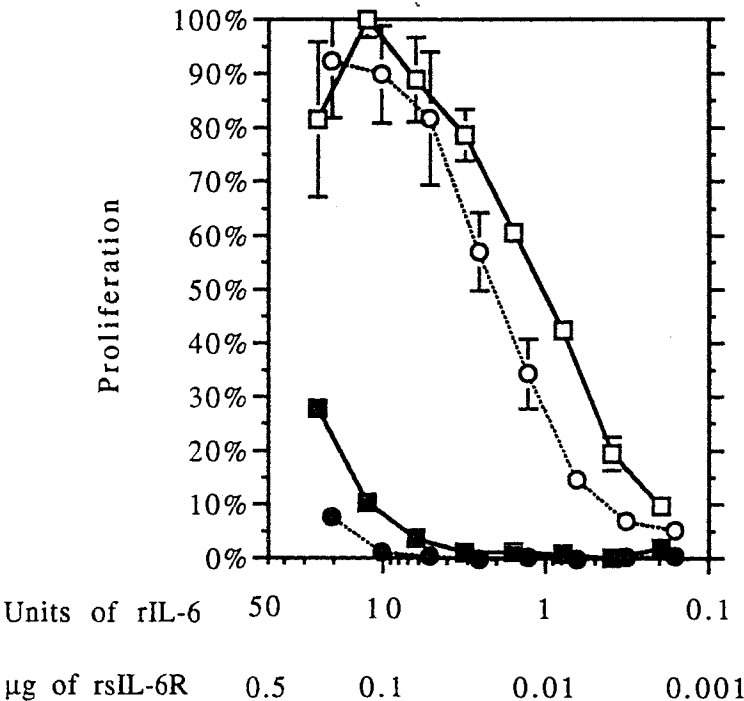


Figure 6



7. DEUXIEME ARTICLE

(Soumis pour publication à la revue "Cytokine")

Les vecteurs adénoviraux possèdent de nombreuses propriétés intéressantes dans le cadre de l'investigation de l'effet d'un gène chez l'animal. Parmi celles ci on peut citer leur capacité de porter jusqu'à 7,5 kb de génome étranger, leur infectiosité de nombreux types cellulaires, la non nécessité de prolifération cellulaire pour exprimer une protéine, leur innocuité, leur relative stabilité et enfin leur manipulation aisée. Nous avons construit un adénovirus recombinant (Ad5.E1.rsIL-6R) dans lequel nous avons inséré le gène codant pour la partie extracellulaire du récepteur à l'IL-6, soit les 358 premiers acides aminés. Ce gène est en position E1 et sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus humain. Nous avons caractérisé par digestion enzymatique puis par hybridation avec une sonde oligonucléotidique spécifique (Southern blot) notre construction. La production d'ARN messagers spécifiques a été vérifiée par une technique de Northern blot sur différents types cellulaires après infection au moyen de virus exprimant le gène codant pour le récepteur soluble ou un gène contrôle (LacZ). La protéine sécrétée dans les surnageants de culture est biologiquement active, puisqu'elle confère la réponse des cellules HepG2 à l'IL-6 de rat. Des anticorps dirigés contre le sIL-6R ont été générés en immunisant des lapins au moyen de Ad5.E1.rsIL-6R et de la protéine recombinante purifiée des cellules d'insectes (baculovirus). La spécificité des immunoglobulines purifiées à partir de différents sérums a été vérifiée par Western blot vis à vis des protéines exprimées dans *E. coli*, les cellules d'insectes ou au moyen d'adénovirus. La bonne spécificité des anticorps nous a permis de mettre au point une technique ELISA pour quantifier le récepteur présent dans les surnageants de culture. Après infection de différentes lignées cellulaires et mesure de la protéine produite dans les surnageants de culture, nous avons pu mettre en évidence une différence d'expression selon le type cellulaire et l'espèce considérés. Cette variation est attribuable en majeure partie au promoteur utilisé (hCMV), qui se révèle être surtout efficace dans les cellules humaines. La quantité de protéine produite est néanmoins considérable (jusqu'à 14 µg/24h/10⁵ cellules), et est prolongée sur une période d'au moins 9 jours. Chez l'animal, nous avons vérifié que l'administration intra-trachéale de Ad5.E1.rsIL-6R induisait une augmentation de la concentration en rsIL-6R dans le lavage broncho-alvéolaire. Cette augmentation est significative et se prolonge une dizaine de jours.

La faible sensibilité de notre ELISA ne nous a pas permis de mesurer la concentration au delà de cette période mais par technique de Western blot associée à une méthode de détection très sensible, le rsIL-6R était détecté 15 jours après l'infection des animaux. Ainsi notre virus déficient pour la réplication produit une protéine biologiquement active et peut augmenter *in vitro* et *in vivo* la concentration de rsIL-6R.

Construction and Characterization of a Replication Deficient Adenovirus Expressing Rat Soluble Interleukin-6 Receptor.

VINCENT THIBAUT^{1,2}, BERNARD TERLAIN², FRANK L. GRAHAM³
AND JACK GAULDIE¹

¹Molecular Virology and Immunology Program, Department of Pathology and ³Biology,
McMaster University, Hamilton, CANADA

²Laboratoire de pharmacologie et URA CNRS 1288, Faculté de Médecine - BP 184
54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex, FRANCE

Running Title: Adenovirus mediated cytokine soluble receptor gene transfer

Key words: Adenovirus/ Gene Transfer/ Rat Soluble Interleukin-6 Receptor

Correspondence to: Dr. J. Gauldie, Department of Pathology, McMaster
University, 1200 Main Street West, Hamilton, Ontario L8N 3Z5, CANADA

tel.: (905)-521 9100 ext. 6332

fax: (905)-577 0198

email: Gauldie@FHS.McMaster.CA

This work was supported by grants from MRC Canada and Rhone-Poulenc Rorer U.K.

The pleiotropic cytokine interleukin-6 mediates its multiple effects at the cell level through a multimeric receptor consisting of a binding protein (gp80) and a signal transducer (gp130). A soluble form of gp80 (sIL-6R or gp54) is found released from the surface of cells and appears to possess IL-6 agonist activity. Increases in circulating level of sIL-6R have been reported in different pathological conditions but the precise role of this protein *in vivo* remains unknown. The cDNA encoding the extracellular domain of the rat IL-6R has been cloned into the E1 region of an adenovirus vector under the control of the hCMV promoter (Ad5.E1.sIL-6R). Infection of different human or rodent cell lines with Ad5.E1.sIL-6R leads to extended production of recombinant protein into the culture media. The kinetics of transgene expression depends both on the cell type and the species. sIL-6R produced in this manner is biologically active as it confers responsiveness of human hepatoma cells (HepG2) to rat IL-6 stimulation. Adenovirus vectors have been shown to be highly effective to transiently deliver cytokines *in vivo*. Antibodies against recombinant soluble IL-6R were generated by immunizing rabbits with sIL-6R expressing adenovirus and several boosts of purified recombinant protein. Using specific IgG preparations we developed an ELISA that allowed us to quantify sIL-6R concentrations. The sIL-6R expressing adenovirus vector has been injected into rats intra-tracheally and showed to induce an increase in lung sIL-6R concentration from day 1 up to day 10. We demonstrate the potency of our system to deliver *in vivo* or *in vitro* soluble cytokine receptors in a transient but sustained manner.

INTRODUCTION

Infection or trauma inflicted on an organism is followed by an immediate local and systemic response aimed at halting tissue destruction, removing the infecting organisms or tissue and restoring the physiologic balance. One of the most potent mechanisms involved in this reaction, is the release of cytokines into the circulation in an ordered and precise manner, with Interleukin-6 (IL-6) in combination with others playing a very important role during such pathologic conditions. IL-6 has been shown more specifically to regulate the acute phase reaction, the immune response and many other crucial components of the homeostatic response (1, 2). IL-6 acts at the surface of cells through a specific receptor, gp 80 or α chain, which binds the IL-6 ligand with low affinity. After the formation of this IL-6/IL-6R complex, a third component, gp130 or β chain, is necessary in order to transduce the signal into the cell. This last step involves a higher affinity interaction between IL-6 and its receptor. Recent data seem to indicate formation of a hexameric complex of two molecules each of IL-6, α chain and β chain (3, 4).

The short intracytoplasmic domain of gp80 has been shown to be unneeded to trigger an IL-6 mediated response. Indeed, a recombinant protein consisting of the extracellular domain of gp80, gp55 soluble IL-6R (sIL-6R), is still able to bind IL-6 and this complex IL-6/sIL-6R by interacting with gp130 induces an intracellular signal (5, 6). Although we possess much information on the possible roles of sIL-6R *in vitro*, its precise role *in vivo* remains unclear even though an effect on the central nervous system has been described (7-13). Availability of an ELISA to measure human or murine sIL-6R reveals the relatively high circulating concentrations of this protein either under normal conditions or during pathologic states (14-16). More recently, severe sepsis and fatal outcome have been associated with elevated levels of sIL-6R (17).

Methods to investigate the physiologic role of a protein depend often on availability of the molecule under consideration in recombinant purified form. Beside injecting recombinant material to an animal, a novel approach to induce a transient increase in the level of a defined protein is to generate a vector carrying the gene encoding for it. Recent data from our lab and

others have proven the potency of recombinant adenoviruses to deliver cytokine genes and therefore induce a sustained increase in circulating level of one particular cytokine (18,26,39-41).

To investigate the physiologic role of sIL-6R in an animal model, we constructed a replication deficient adenovirus vector carrying the gene encoding the extracellular domain of IL-6R (Ad5.E1.rsIL-6R). We describe the molecular strategy we used as well as the characterization of the protein synthesized by this recombinant virus in different cell lines. As previously shown with other adenoviruses expressing cytokines, Ad5.E1.rsIL-6R infected cells secrete high amounts of sIL-6R over a period of at least 10 days. The recombinant protein is biologically active, and intra-tracheal administration of the recombinant vector to rats induces the production of sIL-6R over a period of at least 10 days as detected in bronchoalveolar lavage fluid..

Generation of cDNA encoding rat soluble IL-6R (p55)

Total RNA was prepared from primary rat hepatocytes as previously described (19). A reverse transcription reaction was conducted according to manufacturer protocol using poly-dT as primer and M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL™, USA). The cDNA obtained was amplified by Polymerase Chain Reaction[®] using a set of primers (Mobix, McMaster University) and Vent™ DNA polymerase (New England Biolabs, USA). The first primer spanned the 5' end of the region encoding the signal peptide of IL-6R (according to Baumann et al. (20)) region [GGGCTCGAGGTAGAAGG AACCATG] and the second spanned the junction between the extracellular domain and the transmembrane domain of IL-6R [AGGCGGAATTCATTGCATGGGGC] (the XhoI site and the EcoRI/Stop codon are underlined). The cDNA obtained was cloned into the XhoI/EcoRI sites of Bluescript plasmid (Stratagene, USA) to give “rsIL-6R Blue” and sequenced.

Adenovirus vector

The cDNA encoding rat sIL-6R (1069bp) was cut from “rsIL-6R Blue” by restriction digest with EcoRI/KpnI and subcloned into the multicloning site of pACCMV.PLPASR(+) (kindly provided by Dr. Bob Gerrard, Department of Cardiology, Howard Hughes Medical Institute, University of Texas). pACCMV contains sequentially the left end [1.3 maps unit (mu)] of adenovirus type 5 (Ad5), the hCMV promoter (760 bp), a multicloning site, the Simian Virus 40 splicing and polyadenylation signal, and map units 9.3 to 17 of Ad5. “pACCMV.rsIL-6R” was characterized by restriction digest mapping and then cotransfected with pBHG10 plasmid into 293 cells by calcium phosphate precipitation. pBHG10 lacks the packaging signal ($\Delta\psi$ 194-358 bp) and cannot generate infectious viral vector unless recombined with a second plasmid containing the left end of the genome. Recombinant viruses obtained were plaque purified and their DNA characterized by HindIII restriction digest mapping. One clone was further grown in spinner culture of 293N3S cells. Purification of the high titer virus stock was done by cesium chloride gradient centrifugation and PD-10 gel filtration column as previously described (22). The virus stock was titered on 293 cells and stored at -80°C until

use. Owing to the deletion in the E1 region recombinant viruses obtained by recombination of PBHG10 and pACCMV.rsIL-6R were replication deficient.

DNA and RNA were obtained from 293 cells as previously described and run on Southern and Northern blot according to previously described protocols. The rat sIL-6R probe used was the Styl fragment corresponding to the extracellular domain (63-931 bp).

Animals

Sprague-Dawley rats were injected intratracheally as previously described (21). Basically rats were anesthetized, incised at the trachea level and 300 μ l of virus diluted to the proper concentration in sterile PBS were slowly instilled with a 21 G needle. At different time points, rats were euthanized and the lungs lavaged (BAL) with 3 ml of sterile PBS.

Cell Culture

Infection and stimulation of HepG2 cells or lung fibroblast; determination of acute phase proteins

HepG2 cells were grown in 24 well plates to subconfluency, media (α -MEM, 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, GIBCO™) was removed and the cells were infected with Ad5.rsIL-6R or Ad5 d170-3 (E1 deleted empty vector) at a multiplicity of infection (MOI) of 100 for one hour at 37°C. The media was removed and stimulatory cytokines or diluent alone were added in 300 μ l of fresh media containing 2% FCS. After three days of stimulation, supernatants were collected and analyzed by immuno-rockets.

Rockets: a gel consisting of 75 μ l of antibody (Anti alpha-1 antichymotrypsin, AHPO3, Serotec) mixed with 12.5 ml of 1% agarose was poured and 20 μ l of culture supernatant were electrophoresed overnight (30 mA).

Fibroblasts were grown to subconfluency in 24 well plate in F11 media, 5% FCS, 1% penicillin/ streptomycin (GIBCO™) and infected with recombinant Ad5 vectors for one hour (37°C) at MOI of 25 to 100. Media was removed, cells were washed once with culture media

and further incubated with fresh media (500 µl) containing 1% FCS. Every 24 hours the media was collected and replaced by new media.

Antibodies

Specific antibodies against rat sIL-6R were generated by injecting rabbits with 10^9 p.f.u. of recombinant adenovirus expressing rat sIL-6R. One month later rabbits were boosted with 20 µg of purified rat sIL-6R expressed in a baculovirus expression system as previously described (42). Rabbits were bled 7 days after the last injections, each serum was tested on a Western blot for its ability to detect recombinant protein expressed in different systems (*E. coli*, baculovirus, adenovirus). IgG from the most immunoreactive antiserum and control non-immune serum was purified on a protein A sepharose column (Pharmacia) according to the manufacturer's protocol.

Western Blot

Proteins were run on a 7.5 or 10% polyacrylamide gel under reducing conditions. The gels were transferred onto a nitrocellulose membrane (Immobilon). After blocking for one hour with 5% blotto, 1% BSA, Tween 1 %-PBS, the antibodies were added to a dilution of 1/5,000 in the same solution. Development was done with a secondary antibody (goat anti rabbit, SIGMA) labelled with peroxydase and a chemiluminescence system (Dupont-NEN) according to manufacturers specification.

ELISA

Samples to be measured for concentration of rat sIL-6R were coated on Linbro™ (Flow Laboratories) ELISA plate overnight at 4°C. When dilutions were necessary, PBS was used. A preparation containing a known amount of recombinant rat sIL-6R expressed in a baculovirus expression system was used as a standard. Concentration range of the standard curve extended from 4 to 500 ng/ml. All samples, dilutions and standards were run in duplicate and the mean of two wells was calculated for interpretation. Briefly, 100 µl of the samples were coated overnight at 4°C, the plate was washed three times with Tween-PBS (0.05%) at room temperature and blocked with 100 µl of 1% gelatin in T-PBS for 1 hour at 37°C in a humid atmosphere, then washed three times as previously. 100 µl of specific

antibody diluted 1/1000 were added and left for 1 hour at 37°C. After three washes, a secondary antibody consisting of goat anti-rabbit labelled with peroxidase diluted 1/500 (SIGMA) was added, and after 45 min the plate was washed three times and the enzyme substrate was added (ABTS, SIGMA). The plate was read on a spectrophotometer at 492 nm against a blank consisting of a well coated with PBS only. The data were analysed using the software Deltasoft II (BioMetallics Inc.). When BAL samples were analysed, several dilutions were done (from 1/10 to 1/1280) in duplicate and only the dilutions falling within the standard range were used for interpretation.

RESULTS

Characterization of recombinant adenovirus expressing rat sIL-6R.

The recombinant virus encoding the rat sIL-6R was constructed according to the protocol summarized in Figure 1. A viral plaque was isolated after double plaque isolation and amplified on 293 cells according to previously described techniques (22). After appearance of full cytopathic effect (CPE), cells were harvested and DNA extracted. Digestion of viral DNA with Hind III and electrophoresis onto an agarose gel stained with ethidium bromide showed the expected pattern. Specific bands were hybridized with a probe for sIL-6R on a Southern blot from the same gel (data not shown).

To characterize the production of proper transcripts from cells infected with Ad5.El.sIL-6R, we infected human (HepG2) or rat (H35) hepatocarcinoma cells with different recombinant viruses at a MOI of 100. The cells were collected 3 days after infection and RNA was analyzed by Northern blot hybridization using a specific probe for the extracellular domain of sIL-6R. As shown in Figure 2, we could detect specific mRNA for sIL-6R only in the lanes corresponding to cells infected with Ad5.El.sIL-6R.

Cell infection with Ad5.El.sIL-6R induces production of rat sIL-6R.

Three different cell lines, HepG2, H35 or a primary human lung cell line (HLF) were infected with either Ad5.El.sIL-6R or Ad5.El.LacZ (vector containing a LacZ insert in E1) at a MOI of 100. Crude supernatants were collected 5 days after infection, centrifuged and run on a Western blot. Proteins were revealed with the primary antibody directed against rat sIL-6R. Figure 3 shows clearly a specific band migrating around 55 kDa, indicating the presence of sIL-6R only in the supernatants of cells infected with Ad5.El.sIL-6R and not in the one from cells infected with the control virus.

Rat sIL-6R produced from Ad5.El.rsIL-6R infected cells is biologically active.

IL-6 and its receptor are fairly conserved among species but generally rodent IL-6 cannot act on human cells whereas human IL-6 acts well on rodent cells. As we have previously shown, rat IL-6 can stimulate HepG2 cells to secrete acute phase proteins, only with the concomitant presence of recombinant rat sIL-6R (42). This is the result of the interaction of rat IL-6 with rat sIL-6R, forming a complex which is then able to interact with human gp130 and trigger the intra cellular signal.

Human hepatoma cells (HepG2) were left non infected or infected with either Ad5.El.sIL-6R or Ad5.El.LacZ at a MOI of 100. One day after infection, the media was changed and replaced with fresh media containing different cytokines alone or in combination. The cells were stimulated for two days and the supernatants collected for determination of acute phase protein concentrations. Although rat IL-6 was not able to induce HepG2 cell stimulation per se, Ad5.El.rsIL-6R infected cells responded to rat IL-6 stimulation to the same extent as those stimulated by human IL-6 (Fig. 4). The cells infected by the control virus (Ad5.El.LacZ) did not respond to rat IL-6 stimulation.

Kinetics of production of rat sIL-6R in rodent and human cells infected with Ad5.El.rsIL-6R.

Since adenoviruses do not integrate into the genome of host cells and stay as an episomal form of DNA, it is important to define the kinetics of protein expression, especially the maximal time of recombinant protein production. Rat or human lung fibroblasts and hepatoma cells were infected with Ad5.El.rsIL-6R at a MOI of 100 at day 0 and the media was collected and replaced every day for 9 days. Depending on the cell line and the species, the kinetics of production were quite different (Fig.5). With lung fibroblasts we could detect protein from day 3 up to day 9 with a peak of expression around day 5; with hepatoma cells protein expression occurred a little bit earlier in time and stayed at a constant level for 5 more days. In both cases the time limiting factor was cell survival.

***In vivo* production of rat sIL-6R after intra tracheal injection of Ad5.El.rsIL-6R**

Rats were injected intratracheally with 10^9 pfu of Ad5.El.rsIL-6R or control virus. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed and ELISA data showed kinetics of protein production to be very similar to what we saw *in vitro*: as early as day 1, we were able to measure an increase in recombinant protein concentration, peaking at day 2 and slowly decreasing to below the limit of detection after day 10 in the Ad5.El.rsIL-6R treated animals. None of the BAL recovered from rats injected with the control virus showed detectable concentrations of rat sIL-6R.

DISCUSSION

The soluble extracellular domain of the gp80 IL-6 receptor (sIL-6R), a 45-55 kDa glycoprotein, has been detected at significant levels in biologic fluids such as urine, cerebrospinal fluids and synovial fluids (17,43,44). However, despite evidence *in vitro* that sIL-6R can act as a biologically active component of the IL-6/IL-6R system, little is known about the physiologic role of sIL-6R *in vivo*. Adenovirus vectors have proven to be very efficient at delivering foreign genes *in vivo* and we generated a recombinant adenovirus expressing biologically active rat sIL-6R and showed sustained synthesis and release of this recombinant protein, first in an *in vitro* system and then in an animal model.

Adenoviruses as gene-carriers feature several advantages, among them is the ease to manipulate their genetic material and obtain high titer virus stock, the absence of integration into the host cell genome, their relative safety and their ability to infect non-replicating cells (39). In our approach, we inserted the gene encoding the extracellular domain of IL-6R and its signal sequence in the E1 region of an E1/E3 deleted adenovirus vector under the control of the human CMV (hCMV) promoter. This virus is replication deficient and induces minimal damage to infected cells. We first confirmed with a control virus expressing LacZ and the appropriate staining that hepatoma cells were easily infectable by adenovirus (data not shown) as others have shown (23, 24). RNA isolation from hepatoma cells of two different species, rat and human, clearly demonstrate the difference of activity of the promoter depending on the host (25). Other data from our lab indicate that the hCMV promoter works best in human cells but is also active in rodent cells [Xing, 1994 #1105; and unpublished data]. By integrating the bands on Northern blots and Western blots we could estimate hCMV promoter activity in rodent hepatoma to be around 7 times less active than in human cells. In fibroblasts, the difference is even greater. Activity of the promoter is therefore highly dependent on the type of cells studied even though its activity translates into high recombinant protein production. At the peak of expression, human fibroblasts release a maximum sIL-6R of 13 $\mu\text{g/ml}/10^5$ cells/24 hr whereas rodent hepatoma cells peak at 400 ng/ml/ 10^5 cells/24 hr. This amount of protein produced is in the same range as what we and others have reported earlier with recombinant adenoviruses expressing other cytokines or

proteins (26-28). The kinetics of *in vitro* protein production is also dependent on cell type with steady production from hepatoma cells from day 2 or 3 and a peak expression at day 5 for lung fibroblasts. This heterogeneity of promoter activity as well as other *in vivo* specific parameters make direct extrapolation to animal models difficult.

Injection of rabbits with 10^9 pfu i.p. of adenovirus expressing rat sIL-6R and several boosts with baculovirus purified recombinant material generated a consistent immune response against rat sIL-6R. The sustained production of recombinant protein after infection was well adapted to elicit an immune response. Western blots performed at different times after immunization showed that specific antibodies against rat sIL-6R were present after the first boost and maximum activity was seen after the second challenge (data not shown). An ELISA was established with these antibodies on the basis of an antibody capture assay (37). Serial dilutions of purified baculovirus expressed sIL-6R or adenovirus (Ad5.E1.sIL-6R) infected cell supernatants were prepared in order to make the assay quantitative. The range of linearity was between 10 to 500 ng/ml and we always made interpretation of our data within this interval. Beyond 500 ng/ml we tend to reach a plateau and below 10 ng/ml absorbances were not significantly different from our negative control. One of the disadvantages of this technique is obviously the limited range of concentrations within which to interpret data. The antibody appeared to have suitable specificity since we could not detect (by ELISA or Western blot) sIL-6R in any of the control virus infected cells or BAL from control virus infected animals. To our knowledge this is the first ELISA to measure rat sIL-6R. We are currently working on the development of a sandwich ELISA to expand the range and allow accurate serum level determinations.

We and others have previously characterized the distribution of adenovirus mediated gene delivery when animals were infected into the lungs (21, 29, 30, 40, 41). Basically, the primary cell infected is the bronchial epithelial cell, but all major cell types within the airways are infectable. We have optimized the system of delivery intratracheally and this method of injection into rat lungs allows careful assessment of the production kinetics of the transgene through bronchoalveolar lavage. In our case, since we could not detect any rat sIL-6R in the control virus infected animals at any time, either by Western blot or ELISA, we

were able to follow precisely the kinetics of the production of this recombinant protein. Previous experiments in our lab have shown transient expression of the transgene for at least 5 days and up to 15 days in this strain (Sprague-Dawley) of rats (21,40,41). Others have mostly used Cotton-rats making comparison difficult (31-33). Rat sIL-6R production started very early at day 1 and reach its maximum at day 2, a progressive decrease followed and we could still detect the protein up to day 10 after injection. These kinetics resemble that seen in hepatoma cells and at the peak (day 2) we measured a mean of 1100 ng/ml decreasing at day 10 to 400 ng/ml BAL fluid, levels which are significantly above those detected in human BAL fluid, with or without interstitial lung disease, up to 0.7 ng/ml (44). Total lung sIL-6R in the human is approximately 50 ng/lung, while the gene transfer system used here generated levels from 1.2 µg/lung to 3.3 µg/lung in the rat. Even at the latest time point post infection, the levels of rat sIL-6R were still above those reported in animal serum and certainly high enough to generate biological activity. *In vitro* experiments showed a drop in expression level after day 5 in fibroblasts and a sustained transgene production in hepatocytes up to day 8. *In vivo* the expression kinetics are different and the influence of the host immune response against the viral vector, clearly demonstrated in animal models, and seems to shorten the period of expression (34-36). Rat sIL-6R produced locally might render IL-6R negative cells sensitive to the action of IL-6 and therefore could increase the intensity of the immune response. We did not measure IL-6 in these animals as we have previously shown the presence of sIL-6R in samples markedly affects the B9 hybridoma cell activity assay for IL-6 (42). We currently do not possess an ELISA for rat IL-6.

We have previously shown that purified recombinant rat sIL-6R could confer responsiveness of human hepatoma cells (HepG2) to rat IL-6, this system being the most convenient to test for rat sIL-6R activity (42). Ad5.E1.rsIL-6R infection of HepG2 cells did not modify basal or human IL-6 stimulated acute phase protein production, but stimulation of Ad5.E1.rsIL-6R infected HepG2 with rat IL-6 induced a strong acute phase protein response not seen with control virus (Ad5.E1.LacZ) infected cells. The intensity of the response seen after infection with rat sIL-6R producing vector is very similar to that seen using a combination of recombinant rat sIL-6R and rat IL-6. Basically, we were able to induce a three fold increase in alpha-1 anti chymotrypsin production, a level of stimulation identical to the one induced by

human IL-6 on HepG2 cells. This experiment demonstrates the potency of our approach to provide a receptor component to a cell that lacks part of one receptor. This system could represent to a certain extent what happens *in vivo*, where some cells may shed or release sIL-6R and thereby provide IL-6R negative cells with the appropriate receptor for IL-6 stimulation.

Adenoviral vectors possess numerous advantage to look for protein activities *in vivo* or *in vitro*, in most cases they are innocuous and induce a transient but sustained production of the transgene of interest (38). In our case, we demonstrate for the first time adenovirus mediated production and bioactivity of rat sIL-6R in an *in vivo* model. This gene transfer approach coupled with an immunoassay and bioassay for sIL-6R in the rat will allow future detailed investigations into the physiologic and pathologic roles for the soluble IL-6 receptor.

REFERENCES

1. **Hirano, T., T. Taga, T. Matsuda, M. Hibl, S. Suematsu, B. Tang, M. Murakami, and T. Kishimoto.** 1990. Interleukin 6 and its receptor in the immune response and hematopoiesis. *International journal of Cell Cloning* 8 Suppl 1:155-66; discussion 166-7.
2. **Baumann, H., and J. Gauldie.** 1994. The acute phase response. [Review]. *Immunology Today* 15:74-80.
3. **Ward, L. D., G. J. Howlett, G. Discolo, K. Yasukawa, A. Hammacher, R. L. Moritz, and R. J. Simpson.** 1994. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *Journal of Biological Chemistry* 269:23286-9.
4. **Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga.** 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. [Review]. *Blood* 86:1243-54.
5. **Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto.** 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58:573-81.
6. **Florillo, M. T., C. Toniatti, J. Van Snick, and G. Ciliberto.** 1992. Expression of the murine interleukin 6 receptor in hepatoma cells: the intracytoplasmic domain is not required for interleukin 6 signal transduction. *European Journal of Immunology* 22:799-804.
7. **Hooper, W. C., D. J. Phillips, M. Ribeiro, J. Benson, and B. L. Evatt.** 1995. IL-6 upregulates protein S expression in the HepG-2 hepatoma cells. *Thromb Haemost* 73:819-824.
8. **Mihara, M., Y. Moriya, T. Kishimoto, and Y. Ohsugi.** 1995. Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. *British Journal of Rheumatology* 34:321-5.
9. **Mackiewicz, A., H. Schooltink, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1992. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *Journal of Immunology* 149:2021-7.
10. **Mackiewicz, A., S. Rose-John, H. Schooltink, M. Laclak, A. Gorny, and P. C. Heinrich.** 1992. Soluble human interleukin-6-receptor modulates interleukin-6-dependent N-

- glycosylation of alpha 1-protease inhibitor secreted by HepG2 cells. *FEBS Letters* 306:257-61.
11. **Tamura, T., N. Udagawa, N. Takahashi, C. Miyaura, S. Tanaka, Y. Yamada, Y. Koishihara, Y. Ohsugi, K. Kumaki, T. Taga, and et al.** 1993. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:11924-8.
 12. **Schobitz, B., G. Pezeshki, T. Pohl, U. Hemmann, P. C. Heinrich, F. Holsboer, and J. M. Reul.** 1995. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB journal* 9:659-64.
 13. **Iglesias, M., G. D. Plowman, and C. D. Woodworth.** 1995. Interleukin6 and interleukin-6 soluble receptor regulate proliferation of normal, human papillomavirus-immortalized, and carcinoma-derived cervical cells in vitro. *Am J Pathol* 146:944-952.
 14. **De Benedetti, F., M. Massa, P. Pignatti, S. Albani, D. Novick, and A. Martini.** 1994. Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 93:2114-9.
 15. **Gaillard, J. P., R. Bataille, H. Brailly, C. Zuber, K. Yasukawa, M. Attal, N. Maruo, T. Taga, T. Kishimoto, and B. Klein.** 1993. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *European Journal of Immunology* 23:820-4.
 16. **Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga, and T. Kishimoto.** 1992. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *Journal of Immunology* 148:2175-80.
 17. **Frieling, J. T., M. van Deuren, J. Wijdenes, J. W. van der Meer, C. Clement, C. J. van der Linden, and R. W. Sauerwein.** 1995. Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 171:469- 72.
 18. **Berkner, K. L.** 1988. Development of Adenovirus Vectors for the Expression of Heterologous Genes. *BioTechniques* 6:616-629.
 19. **Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156.

20. **Baumann, M., H. Baumann, and G. H. Fey.** 1990. Molecular cloning, characterization and functional expression of the rat liver interleukin 6 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 265:19853-62.
21. **Xing, Z., T. Braciak, M. Jordana, K. Croitoru, F. L. Graham, and J. Gauldie.** 1994. Adenovirus-mediated cytokine gene transfer at tissue sites. Overexpression of IL-6 induces lymphocytic hyperplasia in the lung. *Journal of Immunology* 153:4059-69.
22. **Graham, F. L., and L. Prevec.** 1991. Manipulation of Adenovirus Vectors. In *Methods in Molecular Biology*, vol. 7. E. J. Murray, ed. The Humana Press Inc., Clifton, NJ, p. 109-128.
23. **Jaffe, H. A., C. Danel, G. Longenecker, M. Metzger, Y. Setoguchi, M. A. Rosenfeld, T. W. Gant, S. S. Thorgeirsson, L. D. Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet, and et al.** 1992. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nature Genetics* 1:372-8.
24. **Yang, Y., S. E. Raper, J. A. Cohn, J. F. Engelhardt, and J. M. Wilson.** 1993. An approach for treating the hepatobiliary disease of cystic fibrosis by somatic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4601-5.
25. **Xu, Z. Z., V. Krougliak, L. Prevec, F. L. Graham, and G. W. Both.** 1995. Investigation of promoter function in human and animal cells infected with human recombinant adenovirus expressing rotavirus antigen VP7sc. *Journal of General Virology* 76:1971-80.
26. **Braclak, T. A., S. K. Mittal, F. L. Graham, C. D. Richards, and J. Gauldie.** 1993. Construction of recombinant human type 5 adenoviruses expressing rodent IL-6 genes. An approach to investigate in vivo cytokine function. *Journal of Immunology* 151:5145-53.
27. **Lindley, T., K. P. Virk, M. Ronchetti-Blume, K. Goldberg, S. G. Lee, J. W. Eichberg, P. P. Hung, and S. M. Cheng.** 1994. Construction and characterization of adenovirus co-expressing hepatitis B virus surface antigen and interleukin-6. *Gene* 138:165-70.
28. **Kopfler, W. P., M. Willard, T. Betz, J. E. Willard, R. D. Gerard, and R. S. Meidell.** 1994. Adenovirus-mediated transfer of a gene encoding human apolipoprotein A-I into normal mice increases circulating high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation* 90:1319-1327.

29. **Crystal, R. G., N. G. McElvaney, M. A. Rosenfeld, C. S. Chu, A. Mastrangell, J. G. Hay, S. L. Brody, H. A. jaffe, N. T. Eissa, and C. Danel.** 1994. Administration of an adenovirus containing the human CFTR CDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis [see comments]. *Nature Genetics* 8:42-51.
30. **Rosenfeld, M. A., G. Ronald, and R. G. Crystal.** 1993. Gene therapy for pulmonary diseases. [Review]. *Pathologie Biologie* 41:677-80.
31. **Rosenfeld, M. A., W. Siegfried, K. Yoshimura, K. Yoneyama, M. Fukayama, L. E. Stier, P. K. Paakko, P. Gilardi, L. D. Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet, and et al.** 1991. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo [see comments]. *Science* 252:431-4.
32. **Rosenfeld, M. A., K. Yoshimura, B. C. Trapnell, K. Yoneyama, E. R. Rosenthal, W. Dalemans, M. Fukayama, J. Bargon, L. E. Stier, L. Stratford-Perricaudet, and et al.** 1992. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 68:143-55.
33. **Zabner, J., D. M. Petersen, A. P. Puga, S. M. Graham, L. A. Couture, L. D. Keyes, M. J. Lukason, J. A. St George, R. J. Gregory, A. E. Smith, et al.** 1994. Safety and efficacy of repetitive adenovirus-mediated transfer of CFTR CDNA to airway epithelia of primates and cotton rats. *Nat Genet* 6:75-83.
34. **Yang, Y., Q. Li, H. C. Ertl, and J. M. Wilson.** 1995. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *Journal of Virology* 69:2004-15.
35. **Yang, Y., and J. M. Wilson.** 1995. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo. *J Immunol* 155:2564-2570.
36. **Engelhardt, J. F., L. Litzky, and J. M. Wilson.** 1994. Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2a. *Human Gene Therapy* 5:121 7-29.
37. **Harlow, E., and D. Lane.** 1988. *Antibodies. A laboratory Manual..* Cold Spring Harbor, New York.
38. **Brody, S. L., and R. G. Crystal.** 1994. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 716:90-101; discussion 101-3.

39. **Bramson, J. L., Graham, F. L., and Gauldie, J.** 1995. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer *in vivo*. *Current Opinion in Biotechnology* 6:590-595.
40. **Braciak, T. A., K. Bacon, Z. Xing, D. J. Torry, F. L. Graham, T. J. Schall, C. D. Richards, K. Croitoru, and J. Gauldie.** 1996. Overexpression of RANTES using a recombinant Adenovirus vector induces the tissue directed recruitment of monocytes to the lung. *Journal of Immunology*, in press.
41. **Foley, R., K. E. Driscoll, Y. H. Wan, T. Braciak, B. Howard, Z. Xing, F. Graham, and J. Gauldie.** 1996. Adenoviral gene transfer of macrophage inflammatory protein-2 in rat lung. *American Journal of Pathology*, in press.
42. **Thibault, V., B. Terlain, and J. Gauldie.** 1996. Characterization and biological activities of recombinant rat soluble Interleukin-6 receptor. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 16, in press.
43. **Frieling, J. T., R. W. Sauerwin, J. Wijdenes, T. Hendriks, and C. J. van der Linden.** 1994. soluble interleukin 6 receptor in biological fluids from human origin. *Cytokine* 6:376-381.
44. **Yokoyama, A., N. Kohno, Y. Hirasawa, K. Kondo, M. Abe, Y. Inoue, S. Fujioka, S. Fujino, s. Ishida, and K. Hiwada.** 1995. Evaluation of soluble IL-6 receptor concentration in serum and epithelial lining fluid from patients with interstitial lung diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 100:325-329.

Fig. 1

Summary of the recombinant adenovirus construction. The cDNA encoding the extra-cellular domain of rat soluble Interleukin-6 receptor was cloned into plasmid pAcCMV to give pACCMV.rsIL-6R that was co-transfected with BHG10 into 293 cells (for details cf. materials and methods).

Fig. 2

Ad5.El.rsIL-6R cell infection gives rise to specific mRNA for rat sIL-6R

Total RNA from different recombinant adenovirus infected HepG2 or H35 cells were analyzed by Northern blot and probed with a sIL-6R specific ³²P labeled oligonucleotide. The upper part shows the specific hybridization only with RNA extracted from Ad5.rsIL-6R infected cells (lanes R), whereas Ad5.LacZ (lanes Z) or Ad5.IL-6 (lanes 6) do not give any signal. The bottom part is the gel stained with Ethidium bromide.

Fig. 3

Antibodies generated in rabbits recognize specifically rat sIL-6R

H35 (lanes A), HepG2 (lanes B) or human lung fibroblasts (lanes C) were infected with either Ad5.rsIL-6R or Ad5.dl and 5 day supernatants were run on 8.5% SDS-PAGE. After transfer, the Western blot membrane was probed with specific rat sIL-6R antibodies and revealed by a chemiluminescent reaction.

Fig. 4

Adenovirus mediated rat sIL-6R expression confers responsiveness to rat IL-6

Two day supernatants from adenovirus infected HepG2 cells were analyzed for alpha 1 anti-chymotrypsin content by immuno-electrophoresis. The graph shows the relative amount of protein produced under different stimulation. Results are expressed as mean +/- SEM.

Fig. 5

Adenovirus mediated rat sIL-6R expression in three different cell lines.

Human lung fibroblast (HLF), rat lung fibroblast (RLF), HepG2 or H35 hepatoma cell lines were infected with Ad5.rsIL-6R and supernatants were collected every 24 hours for 9 days and subjected to a specific ELISA for rat sIL-6R. Results are expressed as mean +/- SEM.

Fig. 6

Rat sIL-6R protein expression in the lung.

Rats were injected intratracheally with 10^9 p.f.u. of Ad5.rsIL-6R and BAL were performed at different time points (day 1 to day 10). Rat sIL-6R was measured by ELISA as described. Results are expressed as mean +/- SEM.

Figure 1

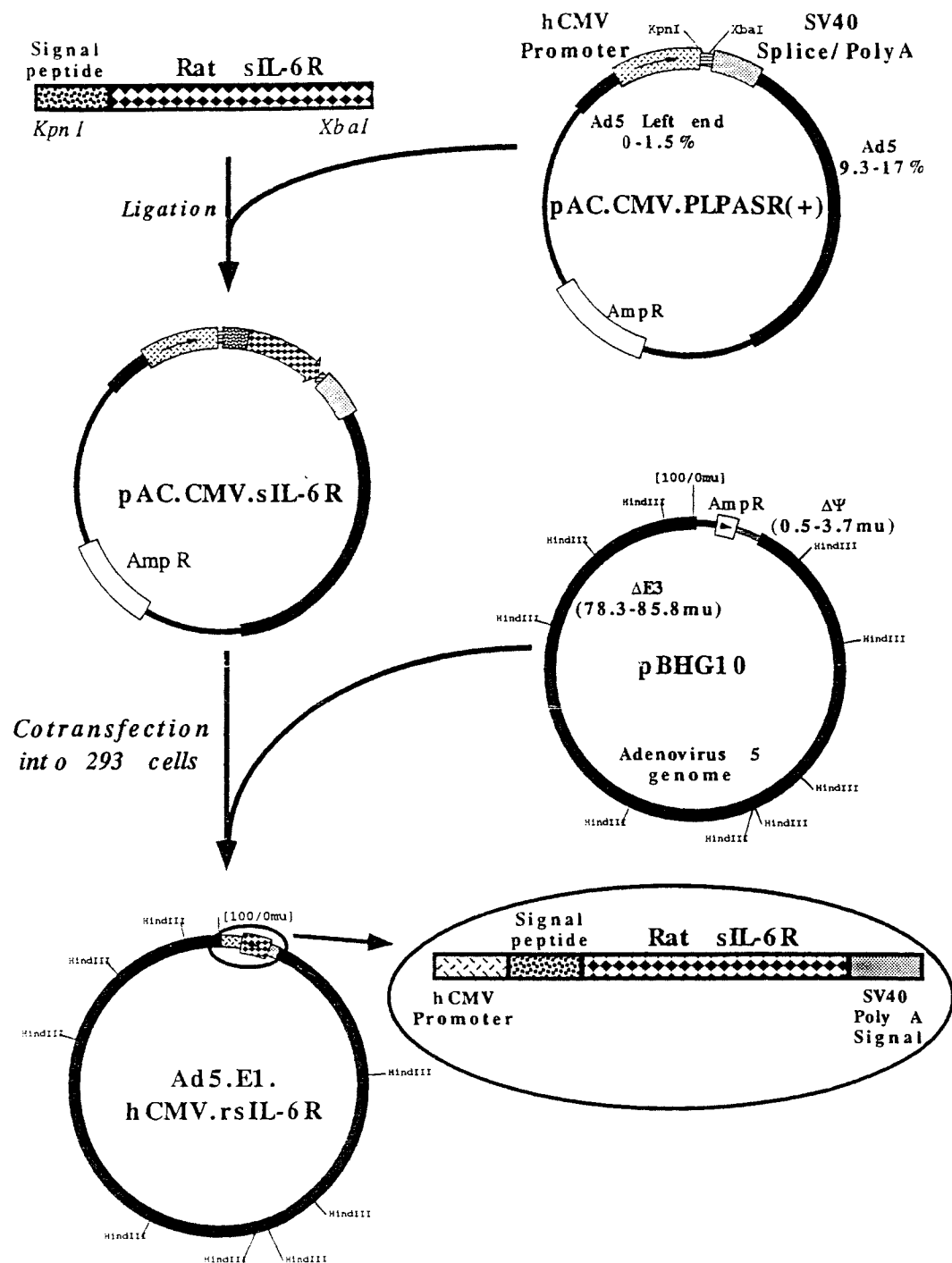


Figure 2

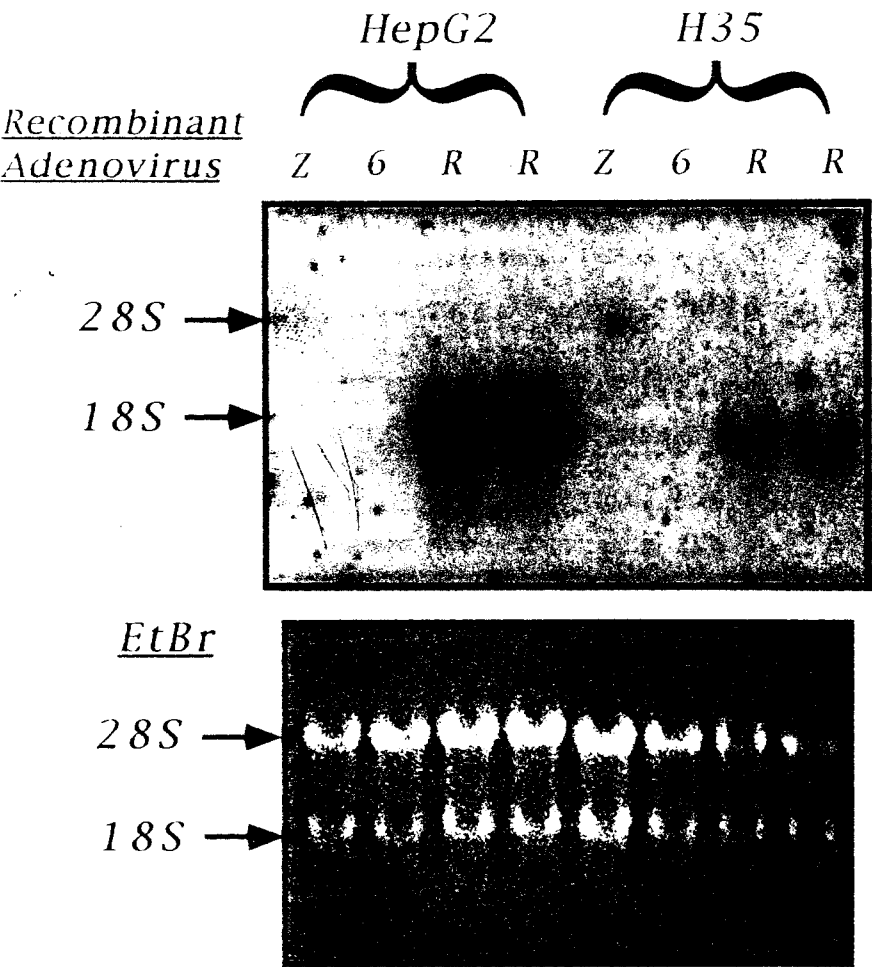


Figure 3

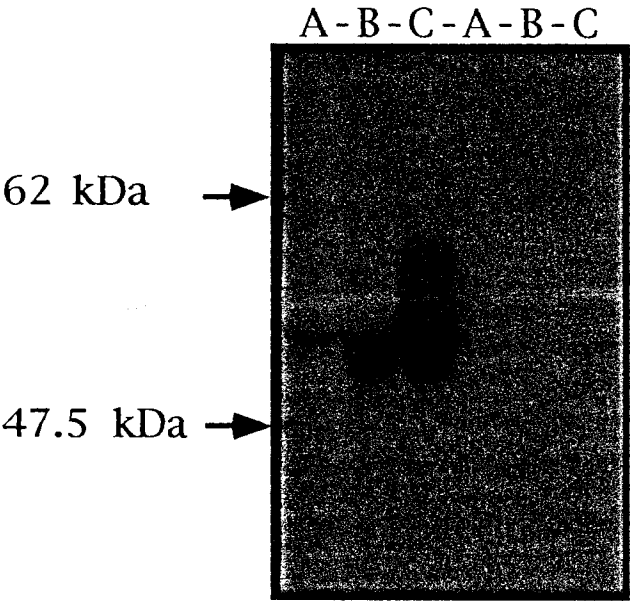


Figure 4

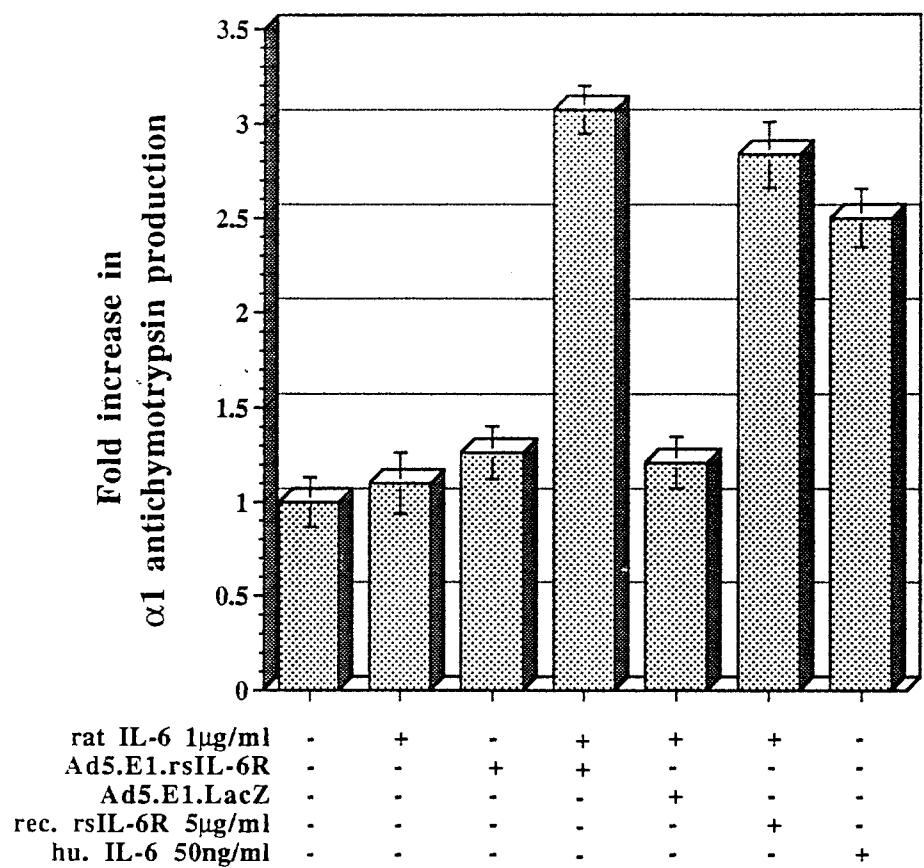
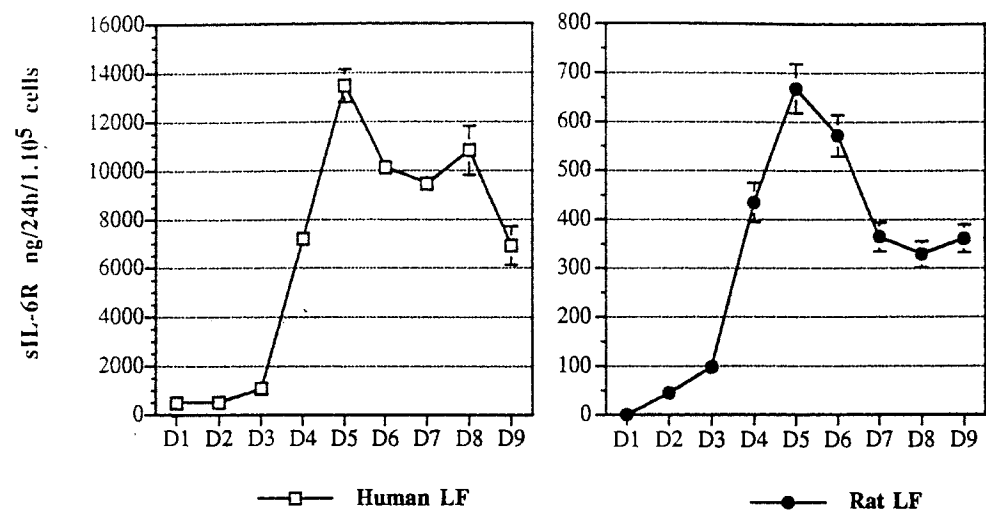


Figure 5



sIL-6R production by two hepatoma cell lines infected with Ad5.E1.sIL-6R

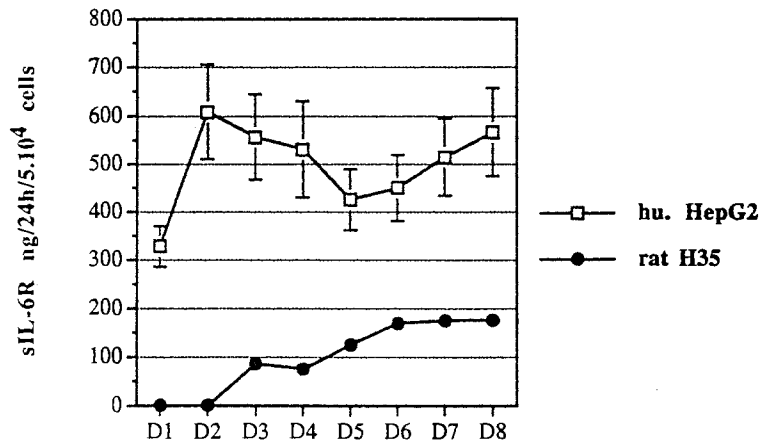
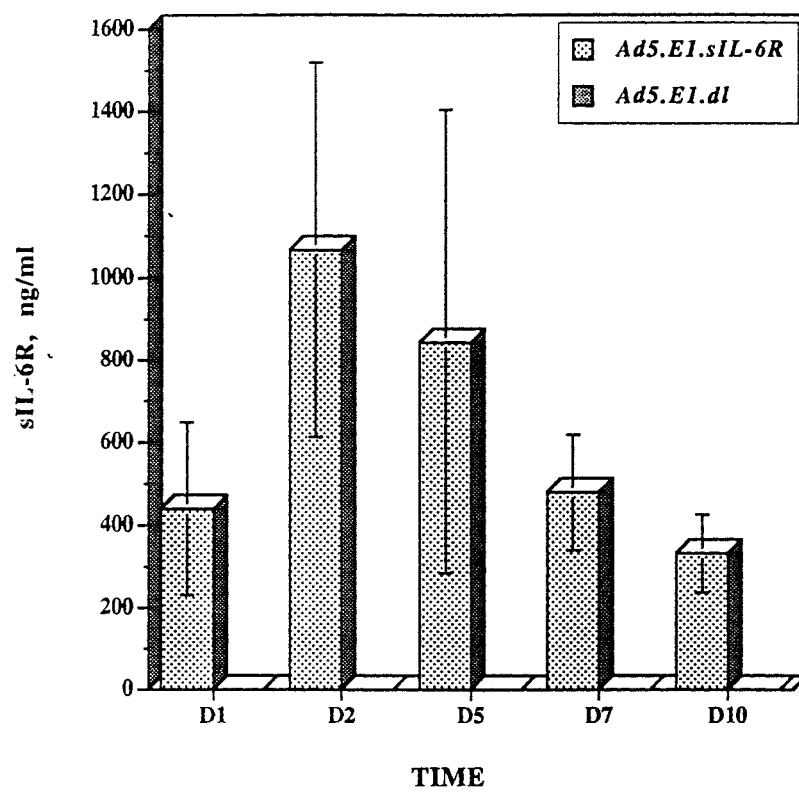


Figure 6



8. TROISIEME ARTICLE

(Manuscrit en préparation)

Dans le précédent article nous avons décrit la construction et la caractérisation d'un adénovirus recombinant, réplication déficient et exprimant le récepteur soluble à l'interleukine-6 de rat. De même, nous décrivions la mise au point d'un ELISA permettant la quantification de cette protéine dans différents milieux biologiques. Cet article est maintenant consacré aux expériences que nous avons réalisées *in vivo*.

Nous avons démontré que l'administration de Ad5.sIL-6R chez le rat induisait une augmentation de la concentration en rsIL-6R pendant une période d'une dizaine de jour. Ainsi, l'adénovirus recombinant que nous avons développé se comporte comme les autres adénovirus exprimant des cytokines et prouve la validité du promoteur utilisé (hCMV) chez le rat. Les expériences ayant mis en jeu l'administration isolée de "Ad5.sIL-6R" nous ont conduit à la conclusion qu'une augmentation du récepteur soluble n'entraînait aucune modification tant au niveau des protéines de la phase aiguë après administration intra-péritonéale qu'au niveau de la morphologie pulmonaire après administration intra-trachéale. Dans le premier cas, seule une très légère augmentation de l'IL-6 sérique peut être rapportée et imputée à la charge virale administrée. Cette modifications est retrouvée aussi avec un adénovirus contrôle. Au niveau pulmonaire le phénomène est similaire et reflète la toxicité relative et locale de l'adénovirus (en particulier des pentons). Le choix judicieux d'une charge virale basse permet néanmoins de réduire considérablement ces phénomènes parasites.

Deux modèles expérimentaux ont été testés lors de l'administration i.p. de "Ad5.sIL-6R". Dans les deux cas, il s'agissait d'observer la modification, due à une concentration élevée de rsIL-6R, de la cinétique de la phase aiguë induite par une augmentation d'IL-6. Cette induction d'IL-6 a été générée soit par une injection s.c. de térébenthine ou un adénovirus recombinant exprimant de l'IL-6 murine. Dans ces deux cas de figure, nous n'avons noté aucune modification significative du décours de la réponse de la phase aiguë.

Après co-injection i.t. de virus exprimant le rsIL-6R et l'IL-6 d'importantes modifications sont apparues histologiquement au niveau pulmonaire. Alors que l'IL-6 seule n'induit qu'une inflammation modérée et résolutive en cinq jours environ, la présence de la cytokine et de son récepteur soluble modifie radicalement l'architecture pulmonaire avec apparition de lésions de type fibrotique. Ces stigmates apparaissent dès le cinquième jour et persistent au delà de 15 jours; une irréversibilité n'est pas entièrement prouvée et les remaniements majeurs observés tendent à diminuer considérablement vers le 28ème jour laissant toutefois un tissu de type cicatriciel chez certains animaux.

La fonction du récepteur soluble systémiquement semble donc très modérée, cependant, au niveau pulmonaire, le rsIL-6R pourrait favoriser le recrutement de cellules ne possédant pas de récepteur à l'IL-6 à leur surface et induire des réactions spécifiques. D'autres systèmes pourraient être également affectés par la présence de ces deux molécules.

Adenovirus Vector Mediated Gene Transfer of Rat Soluble Interleukin-6 Receptor and IL-6 in The Lungs Induces Fibrosis

Vincent Thibault^{#*}, Zhou Xing[#], Bernard Terlain^{*}, Frank L. Graham[¥]
and Jack Gauldie[#].

[#]Molecular Virology and Immunology Program, Department of Pathology and [¥]Biology,
McMaster University, Hamilton, CANADA

^{*}Laboratoire de pharmacologie et URA CNRS 1288, Faculté de Médecine - BP 184
54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex, FRANCE

INTRODUCTION

One of the most potent mechanism of defense after any kind of injury inflicted to an organism is the very rapid release of cytokines aiming at restoring the physiologic homeostasis. Interleukin-6 (IL-6) is one of those mediators and seems to play an important role on different sides of this response, and more specifically in regulating the acute phase response (1). Others cytokines, such as Oncostatin-M (OM), Leukemia Inhibitor Factor (LIF), Interleukin-11 or Cardiotrophin-I (CT-I) have also been shown to control the synthesis of acute phase proteins either *in vitro* on hepatocytes or *in vivo* in different animal models (2). Amazingly, all these cytokines belong to the hematopoietic cytokine family and share a common receptor subunit described as a glycoprotein of 130 kDa (gp 130) (3, 4). A specific receptor for each of these proteins can, after binding with its ligand, interact with gp 130 alone or in combination with a third component, this multimeric complex is then able to transduce a specific signal into the cell. This mechanism makes this system very similar to what has been described for other cytokines sub-family such as IL-3, IL-5 and GM-CSF (5).

In the case of IL-6, another parameter interferes with IL-6 biological activities at least *in vitro*; a soluble form of IL-6 receptor (gp 80) has been shown to be released from cell cultures under different stimuli and is found in the circulation of different species (6-8). This protein of 55 kDa consists of the extra cellular domain of the entire receptor and still possesses its ability to bind its ligand as well as gp 130 and therefore is able to mediate an IL-6 response. Its mechanism of release remains controversial and could, depending on the cell type, involve shedding of IL-6R from the surface of the cell or differential splicing of a common IL-6R mRNA precursor (9-15). Since this soluble form bound to its ligand is able to interact at the cell surface with gp 130 and generate an IL-6-like effect, it is considered as an agonist in contrary to what is known for other soluble receptors such as IL-4sR or LIFsR (16).

In vivo data have shown the presence of circulating soluble IL-6R in human and mice with comparable levels varying between 20 to 150 ng/ml. Physiologic variations occur during different conditions such as hematological disorders or infectious diseases (6, 7, 17-22). More important, elevated levels have been reported in interstitial lung diseases such as sarcoidosis or interstitial pneumonia (23). Even though *in vitro* data from us and others have clearly

established an agonist activity on different cell types, its specific role in an animal model remains unknown.

Recombinant adenoviruses possess many advantages when one wants to look at a particular cytokine effect *in vivo* (24). Several studies from us and others have shown that E1 recombinant viruses, i.e. replication deficient, when injected into animals induce an increase in transgene concentrations for a period ranging from one to more than three weeks (25-28). Depending on the route of injection, one can selectively target one or more sites of transgene expression. Using either luciferase or β -galactosidase expressing adenoviruses it has been shown that intra-peritoneal injections tend to lead the transgene expression towards the spleen and the liver and therefore induce a systemic increase of the transgene concentrations, whereas intra-tracheal injections limit the virus almost exclusively to the lung (29). The transient but sustained production of the transgene induced by recombinant adenoviruses makes them as perfect vectors to study cytokines that are characterized by a short half life *in vivo*.

We have generated a replication deficient recombinant adenovirus expressing rat soluble interleukin-6 receptor under the human cytomegalovirus promoter (Ad5.E1.rsIL-6R). In this study, we injected by two different routes this recombinant virus to induce a transient increase of the level of sIL-6R in rats and we examined its effects on different parameters. We first show that, as previously described with other cytokine recombinant viruses, we induced a sustained increase in the level of sIL-6R *in vivo* that lasted for at least ten days as measured with our specific ELISA. We then looked at the biological consequences of an increase of sIL-6R either locally in the lung or systemically under normal or inflammatory conditions. An increase in circulating sIL-6R did not change the kinetics nor the intensity of the acute phase response either at its basal level or after a turpentine challenge. Single intra-tracheal injection of Ad5.E1.sIL-6R did not change the histological aspects of the lung and we could only notice a non specific minor inflammatory reaction. Yet, i.t. co-administration of Ad5.E1.rsIL-6R and Ad5.E1.rIL-6, an IL-6 expressing adenovirus, into the lungs induced major histological changes characterized by a fibrotic response within 10 days. Those lesions were not seen when using twice the dose of either sIL-6R or IL-6 expressing adenovirus alone.

MATERIAL AND METHODS.

Animals

Male Sprague Dawley rats (Charles River) weighing 280 - 300 g. were kept individually in separate cages.

I.p. injections: in the case of turpentine challenge, 150 μ l of turpentine was injected subcutaneously on the back of each animal, blood was taken under anesthesia from the tail vein every day for 7 days. At the end of this period rats were sacrificed by bleeding them out from the abdominal aorta; spleen, heart and liver were taken at that point, fixed by immersion in a solution containing 2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in PBS. Whenever we used adenovirus, rats were injected intra peritoneally with 300 μ l. of viral suspension adjusted to the proper concentration.

I.t. injections were realized as previously described. Basically rats were anesthetized, incised at the trachea level and 300 μ l of virus diluted to the proper concentration in sterile PBS were slowly instilled through a 21 G needle. At different time points, rats were euthanized and BAL were performed with 3 ml of warm (37°C) sterile PBS. BAL were kept at - 20°C until analysis, cells were spun down and counted. Lungs were taken, fixed with a Formalin solution by intratracheal infusion and immersion, transferred in 70% ethanol after 24 hours, paraffin embedded, sectioned and stained with hematoxylin-eosin.

Adenoviruses

Adenovirus constructs were made as previously described (30). Briefly, Ad5.E1.rsIL-6R was made by inserting the cDNA encoding for the extracellular domain of rat interleukin-6 receptor (1069 first bp) in a shuttle vector pACCMV.PLPASR(+) (kindly provided by Dr. Bob Gerrard at the Department of cardiology, Howard Hughes Medical Institute, University of Texas), downstream of the human cytomegalovirus promoter (760bp) and upstream of a polyadenylation signal. This recombinant shuttle plasmid was co-transfected with pBHG10 in 293 cells, specific recombinant virus was selected through two rounds of plaque purification, amplified and purified by CsCl gradient centrifugation followed by gel filtration chromatography. Other viruses were previously described (25, 31).

sIL-6R ELISA

ELISA for sIL-6R was performed as previously described: sample (BAL) duplicates were coated onto Linbro 96 well plate overnight at different dilution in PBS and a range of recombinant sIL-6R concentrations from 10 ng/ml to 1 mg/ml was included as standard on each plate. After washing with 0.05% Tween-PBS, plates were incubated with a specific rabbit antibody against rsIL-6R for one hour. After extensive washes, antibodies bound to the protein were detected with a goat anti rabbit antibody labeled with peroxidase (SIGMA) and detected by incubation with a specific substrate. Data were analyzed using the software Deltasoft II (BioMetallics Inc.).

B9 assay

B9 assay was conducted as previously described (32). Basically, B9 cells were washed three times in IL-6 free media, adjusted to a concentration of 50,000 cells/ml and 50 µl were added to 50 µl of sample containing unknown amount of cytokine. After 72 hours of incubation at 37°C, proliferation was measured by adding the tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium [MTT] and incubated for a further 4 hours. The reaction was stopped with an HCl-SDS solution and optical densities were read the following day at 475nm.

Determination of Cystein Protease Inhibitor (CPI) serum concentration

At each specified time points, rats were bled from the tail vein and blood was collected in glass tubes, left at 37°C for one hour, spun down and serum was separated from the clot and frozen at -20°C until CPI determination.

Amount of CPI in the sera was determined by rocket electrophoresis as previously described (33, 34): basically 100 µl of antibody (Anti CPI) was mixed with 12.5 ml of 1% agarose, poured on a glass plate and 20 µl of serum were run overnight.

RESULTS

Turpentine-induced acute phase response is not modified by an increase in circulating rat soluble IL-6 receptor.

Turpentine, when injected subcutaneously, is a major inductor of inflammation. Contrary to other stimuli such as Freund's adjuvant, its effect is mostly mediated by IL-6 as demonstrated by its lack of effect in IL-6 deficient mice (35). Therefore, we looked at the level of acute phase protein after a turpentine challenge (150 μ l) s.c. in rats injected (i.p.) with Ad5.E1.rsIL-6R or Ad5.E1.dl. We and others have previously shown that i.p. injections of recombinant adenoviruses carrying foreign genes are able to induce a systemic transient increase in circulating levels of foreign protein and that i.t. injections induce a rather local increase.

In order to better evaluate the rsIL-6R effects on an IL-6 mediated event *in vivo*, we looked at CPI levels following a turpentine challenge. Fig. 1 represents the levels of CPI during the time course of the experiments involving 6 rats each time point. 3 Rats were injected at day 0 with either Ad5.E1.dl (1×10^9 p.f.u.) i.p. or Ad5.E1.rsIL-6R (1×10^9 p.f.u.) i.p. with or without turpentine (150 μ l) s.c. . The experiment was repeated twice. Every 24 hours, rats were bled and IL-6 and CPI levels measured. No differences were seen either at the IL-6 level (data not shown) or at the CPI level. It is noteworthy that different organs were taken at the end of these experiments (especially spleens, heart and liver) and we never noticed any difference, with regard to the size and the histological aspect, between the different groups of rats.

In a second set of experiments, we used a different strategy consisting in injecting at the same time Ad5.E3.rIL-6 (5×10^8 p.f.u.) and Ad5.E1.rsIL-6R (5×10^8 p.f.u.) or Ad5.E1.dl (5×10^8 p.f.u.) i.p. . The purpose of this, was to induce a transient and parallel increase of IL-6 and sIL-6R in normal rats and to look at the acute phase response. Once again, we did not find any difference in term of CPI or IL-6 levels following co-administration of those viruses (Fig. 2). Interestingly, the kinetics of the acute phase response, induced by the Ad5.E3.IL-6 virus, followed the one seen after injection of turpentine.

I.T. injection of an adenovirus expressing rsIL-6R induces an increase in the BAL content of rsIL-6R.

Lungs represent a very potent system to look at when studying adenovirus mediated gene delivery (25-27, 36). In fact, we have shown that intra-tracheal injection of adenoviruses, is a very reproducible method since these viruses can infect very efficiently lung epithelial cells and induce production of the recombinant protein into the lung lumens; thus, BAL performed at different time points give a good picture of the level and the kinetics of recombinant protein production *in vivo*.

We injected rats at day 0 with Ad5.E1.rsIL-6R (1×10^9 p.f.u.) or Ad5.E1.dl (1×10^9 p.f.u.) and performed BAL at day 1, 2, 4, 5, 7 and 10. rsIL-6R concentrations were measured with our specific ELISA for rsIL-6R. As seen on Figure 3, the level of recombinant protein increased as soon as day 1 and persisted in the BAL for 10 days. The experiment was followed up to later time points and even though we could detect the recombinant protein in some BAL run on Western blot, owing to the poor sensitivity of our ELISA we were unable to give reliable figures on those. These experiments provided us with kinetics similar to those described previously with an adenovirus expressing IL-6.

Increased level of IL-6 and sIL-6R locally into the lungs is associated with dramatic histological changes

In order to better investigate the local effect of an increase in sIL-6R, we looked at the lungs of animals injected with either Ad5.E1.rsIL-6R (1×10^9 p.f.u.) or Ad5.E1.dl (1×10^9 p.f.u.) or a combination of Ad5.E1.rsIL-6R (5×10^8 p.f.u.) and Ad5.E3.rIL-6 (2×10^8 p.f.u.). These virus loads were calculated from previous experiments realized with a combination of Ad5.E3.rIL-6 and Ad5.E1.dl in order to minimize a cytotoxic effect induced only by the amount of viral particles. In the rats injected with Ad5.E1.rsIL-6R we did not find any major changes as compare to our control group injected with Ad5.E1.dl. As with other recombinant adenovirus vectors, we noticed a slight inflammatory reaction occurring mostly from day 2 up to day 7 and resolving by day 10. This reaction consists of a peribronchial lymphocytosis and a volume increase of the lung associated lymphoid organs (LAL). When we used a

combination of Ad5.E1.rsIL-6R and Ad5.E3.rIL-6 we observed dramatic morphological changes as compare to our control group (Ad5.E1.dl and Ad5.E3.rIL-6). In the last group the "normal" inflammatory reaction, induced by the injection of viral particles, was highly enhanced with major peribronchial lymphocytosis and hyper expansion of the LAL occurring at day 7. By day 10, this phenomena starts to decline and by day 15 only residual foci can be observed in some areas. In the group that received Ad5.E1.rsIL-6R and Ad5.E3.rIL-6, the inflammatory response occurred earlier (by day 5) and evolved towards a fibrotic phenomena. We observed different stages of fibroblastic proliferation; at day 5 a major inflammatory reaction occurred, stronger than the one seen by injection of Ad5.E3.IL-6 alone, and localized around the airways, later on, at day 7, a proliferative response took place with hypertrophy of fibroblastic cells. At day 10 and 15 the picture was very similar with a dramatic expansion of the fibroblastic population within several lobes, this was in contrast with the control group that shows more or less complete resolution of its inflammatory response induced probably by the viral burden. Finally, at day 28 the fibroblastic response seen in the IL-6/sIL-6R group was still present although to a lesser degree, and in the control group there was no more sign of the viral injection.

DISCUSSION

The hematopoietic cytokine family is a wide group of cytokines sharing a very similar structure and acting through a common signal transducer gp130. Specificity of each cytokine seems to be dictated by the presence of a specific receptor for each of them. In the case of IL-6, a soluble form of its receptor is able to generate an agonistic activity as long as it can interact with both its ligand and gp130, therefore we may wonder why a combination of IL-6/sIL-6R do not trigger any cell bearing gp 130 at its surface. Our system was designed in order to investigate the role of circulating sIL-6R in a homologous rat model. We constructed a replication deficient recombinant adenovirus expressing rsIL-6R and injected it into rats under different situations.

Intra peritoneal injection of recombinant adenovirus carrying a foreign gene has been very well studied by us and others, it induces a transient increase in the circulating level of the transgene lasting from 7 days to over 28 days depending on which animal and transgene one looks at. Following administration by this route, highest concentrations of the foreign protein are mostly found in the liver and the spleen (25, 29). We delivered i.p. 10^9 p.f.u. of Ad5.E1.sIL-6R or Ad5.E1.dl to normal rats and looked at the level of IL-6 and acute phase proteins the following 7 days. Interestingly, we did not find any change of those two markers of inflammation neither in the control nor in the sIL-6R group. We can conclude that in normal conditions, *i.e.* when there is no induced change in circulating IL-6, an increase in sIL-6R does not change the acute phase response status. Seven days after injection we sacrificed the animals and looked at their livers, spleens, hearts, lungs, we did not notice any major change but in some of them a slight splenomegaly not associated with particular histological changes. Even though the kinetics of expression is rather short, owing to an immune response induced against adenovirus proteins, we could have seen changes due to a pleiotropic action of IL-6 on gp130 bearing cells such as the one seen by Kishimoto and co-workers on the heart and on the lungs (37, 38).

Turpentine is known as a potent inducer of acute phase response through an IL-6 dependent mechanism, we used this model to look at the effect of sIL-6R during an acute phase reaction.

Turpentine induced IL-6 production started to increase within 24 hours, reaching a maximum by day 2, no statistical difference was seen when we compared either IL-6 or CPI level in the two groups of rats. The kinetics were also identical. This is different to what Rose-John and his collaborators reported in transgenic mice for hsIL-6R (39). In their model, an injection of hIL-6 in homozygous mice (hsIL-6R +/+) induces a quicker and more intense response than in heterozygous (hsIL-6R +/-) or control mice (hsIL-6R -/-) in term of IL-6 level as well as acute phase protein synthesis. Even though we know that the receptor from the two species show some similarities, it is difficult to predict what would be the interactions *in vivo* between hIL-6, hsIL-6R and murine gp130 and the influence of the natural msIL-6R and mIL-6 in their hsIL-6R transgenic mice. Our system possesses the advantage of being homologous for the rat and therefore closer to the physiologic situation. When we used another approach, consisting of co-injection of two recombinant adenoviruses expressing rsIL-6R and rIL-6 respectively, our conclusions were identical and we did not see, in term of acute phase response, any differences as compare to the control group that received two recombinant adenoviruses expressing LacZ and rIL-6. As we did in our first set of experiments, we looked at major organs at the end of the experiment (day 8) and did not find any histological changes in the different animal groups.

Administration of recombinant adenoviruses expressing cytokines in the lung allows to study a local effect of the considered transgene (27, 36). Cell populations infected after i.t. administration are well defined, and lungs can be easily explored thoroughly. Single administration of Ad5.E1.rsIL-6R is, as seen with other cytokines, very efficient in increasing the BAL rsIL-6R content. As early as 24 hours we could measure rsIL-6R at concentrations of 15 µg/ml which is the peak of expression, then levels started slowly to decrease and we could not anymore detect the protein on Western Blot by day 15. Our construct and the promoter we used (hCMV) revealed to be very efficient *in vivo*. High concentrations of rsIL-6R in the lungs did not cause any major histological changes in the lungs but the well described inflammatory reaction observed 5 to 7 days after virus infection. This reaction is not specific and tends to resolve spontaneously by day 7 or 10. Usually, it is characterized by a lymphocytic proliferation in the lung associated lymphoid tissue which is limited to peri-bronchiolar sites. This reaction is a normal reaction to the viral burden which in our case is

10⁹ p.f.u. . Presence of an important concentration of rsIL-6R did not modify the course of this event, even though we could detect a slight and rapid increase in IL-6 in the BAL of the rats from the two groups (control or sIL-6R). This IL-6 increase is part of the physiologic response following adenovirus administration (40).

Even though we demonstrated that rsIL-6R did not change the course of a slight inflammatory response such as the one induced by adenovirus instillation, we looked at what occurs during a major IL-6 induction. For this purpose, we co-administered two adenoviruses expressing rsIL-6R or LacZ and rIL-6. We know the dramatic increase in rIL-6 induced by Ad5.E3.rIL-6 after i.t. administration, co-infection with a second adenovirus (expressing rsIL-6R or LacZ) did not modify either the time course or the intensity of the IL-6 production. Histologically, we observed dramatic changes in the group receiving the two vectors expressing rsIL-6R and rIL-6 and very little in the other (LacZ, rIL-6). Contrary to what we described after administration of Ad5.E3.IL-6, the simultaneous rsIL-6R and rIL-6 increases induced a fibroblastic response as materialized by thickening of the alveoli walls and expansion of fibroblast-like cells. This feature had never been seen with any of the recombinant viruses we studied so far and resembles a fibrotic response. It occurs quite early and seems to be partially reversible. Presence of IL-6 and sIL-6R may recruit cells that are usually not responsive to IL-6 or may increase an IL-6 response on cells that possess low number of IL-6 receptors. The relatively transient increase of sIL-6R and its ligand may not be appropriate to induce permanent damage at the tissue site but seems to indicate participation of IL-6 or IL-6-like cytokines in fibrotic events. Physiologic concentrations of sIL-6R have been reported in the lungs and have been shown to increase in interstitial lung diseases (23).

We knew the effect of sIL-6R in different systems such as osteoblast differentiation or hematological disorders, in our case it is a new area of investigation that we put insight. The relevance of sIL-6R in pulmonary diseases remains to be further investigated.

REFERENCES

1. **Xing, Z., C. D. Richards, T. Braciak, V. Thibault, and J. Gauldie.** 1995. Cytokine regulation of hepatic acute phase protein expression. In *Cytokines and the liver, Falk symposium 78*. W. Gerok, K. Decker, T. Andus, and V. Gross, eds. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, p. 164-171.
2. **Baumann, H., and J. Gauldie.** 1994. The acute phase response. [Review]. *Immunology Today* 15:74-80.
3. **Zhang, X. G., J. J. Gu, Z. Y. Lu, K. Yasukawa, G. D. Yancopoulos, K. Turner, M. Shoyab, T. Taga, T. Kishimoto, R. Bataille, and et al.** 1994. Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *Journal of Experimental Medicine* 179:1337-42.
4. **Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga.** 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. [Review]. *Blood* 86:1243-54.
5. **Kishimoto, T., T. Taga, and S. Akira.** 1994. Cytokine signal transduction. [Review]. *Cell* 76:253-62.
6. **Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga, and T. Kishimoto.** 1992. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *Journal of Immunology* 148:2175-80.
7. **Suzuki, H., K. Yasukawa, T. Saito, M. Narazaki, A. Hasegawa, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1993. Serum soluble interleukin-6 receptor in MRL/lpr mice is elevated with age and mediates the interleukin-6 signal. *European Journal of Immunology* 23:1078-82.
8. **Frieling, J. T., R. W. Sauerwein, J. Wijdenes, T. Hendriks, and C. J. van der Linden.** 1994. Soluble interleukin 6 receptor in biological fluids from human origin. *Cytokine* 6:376-81.
9. **Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle, and N. J. Maihle.** 1992. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 4:96-100.

10. **Korholz, D., P. Nussbaum, B. Pafferath, C. Mauz-Korholz, L. Hempel, and S. Burdach.** 1994. Activation of protein kinase C induces de novo synthesis of the soluble interleukin-6 receptor in human B cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 40:515-20.
11. **Horiuchi, S., Y. Koyanagi, Y. Zhou, H. Miyamoto, Y. Tanaka, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto, and N. Yamamoto.** 1994. Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *European Journal of Immunology* 24:1945-8.
12. **Snyers, L., J. C. Renauld, C. Szpirers, and J. Content.** 1995. Cloning and chromosomal localization of a pseudogene corresponding to a mRNA for a soluble IL-6 receptor. *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping* 5:311-314.
13. **Lust, J. A., D. F. Jelinek, K. A. Donovan, L. A. Frederick, B. K. Huntley, J. K. Braaten, and N. J. Maihle.** 1995. Sequence, expression and function of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor (sIL-6R). *Curr Top Microbiol Immunol* 194:199-206.
14. **Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European Journal of Immunology* 23:473-80.
15. **Mullberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1994. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *Journal of Immunology* 152:4958-68.
16. **Rose-John, S., and P. C. Heinrich.** 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal* 300:281-290.
17. **Maeda, T., M. Yamaguchi, T. Taga, T. Kishimoto, K. Wada, H. Ikegami, H. Kurachi, and A. Miyake.** 1994. Decidua is a possible source of serum mouse soluble interleukin-6 receptor (msIL-6R): gestational profile of serum msIL-6R concentration. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 205:998-1003.
18. **Yamaguchi, M., A. Mammoto, T. Taga, T. Kishimoto, and A. Miyake.** 1995. Regulation of mouse soluble interleukin-6 receptor secretion by decidua. *Biochem Biophys Res Commun* 211:1077-1082.

19. **Lehrnbecher, T., L. Schrod, D. Kraus, T. Roos, J. Martius, and H. B. Vonstockhausen.** 1995. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in cord blood in the diagnosis of early onset sepsis in neonates. *Acta Paediat* 84:806-808.
20. **Frieling, J. T., M. van Deuren, J. Wijdenes, J. W. van der Meer, C. Clement, C. J. van der Linden, and R. W. Sauerwein.** 1995. Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 171:469-72.
21. **Rier, S. E., P. N. Zarmakoupis, X. Hu, and J. L. Becker.** 1995. Dysregulation of interleukin-6 responses in ectopic endometrial stromal cells: correlation with decreased soluble receptor levels in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 80:1431-7.
22. **Gaillard, J. P., R. Bataille, H. Brailly, C. Zuber, K. Yasukawa, M. Attal, N. Maruo, T. Taga, T. Kishimoto, and B. Klein.** 1993. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *European Journal of Immunology* 23:820-4.
23. **Yokoyama, A., N. Kohno, Y. Hirasawa, K. Kondo, M. Abe, Y. Inoue, S. Fujioka, S. Fujino, S. Ishida, and K. Hiwada.** 1995. Evaluation of soluble IL-6 receptor concentration in serum and epithelial lining fluid from patients with interstitial lung diseases. *Clinical & Experimental Immunology* 100:325-9.
24. **Richards, C. D., T. Braciak, Z. Xing, F. Graham, and J. Gauldie.** 1995. Adenovirus vectors for cytokine gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 762:282-292;.
25. **Braciak, T. A., S. K. Mittal, F. L. Graham, C. D. Richards, and J. Gauldie.** 1993. Construction of recombinant human type 5 adenoviruses expressing rodent IL-6 genes. An approach to investigate in vivo cytokine function. *Journal of Immunology* 151:5145-53.
26. **Xing, Z., T. Braciak, M. Jordana, K. Croitoru, F. L. Graham, and J. Gauldie.** 1994. Adenovirus-mediated cytokine gene transfer at tissue sites. Overexpression of IL-6 induces lymphocytic hyperplasia in the lung. *Journal of Immunology* 153:4059-69.
27. **Xing, Z., T. Braciak, Y. Ohkawara, J. M. Sallenave, R. Foley, P. J. Sime, M. Jordana, F. L. Graham, and J. Gauldie.** 1996. Gene transfer for cytokine functional studies in the lung: The multifunctional role of GM-CSF in pulmonary inflammation. *J Leukocyte Biol* 59:481-488.

28. **Addison, C. L., T. Braciak, R. Ralston, W. J. Muller, J. Gauldie, and F. L. Graham.** 1995. Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8522-8526.
29. **Mittal, S. K., A. J. Bett, L. Prevec, and F. L. Graham.** 1995. Foreign gene expression by human adenovirus type 5-based vectors studied using firefly luciferase and bacterial beta-galactosidase genes as reporters. *Virology* 210:226-230.
30. **Hitt, M., A. J. Bett, C. L. Addison, L. Prevec, and F. L. Graham.** 1995. Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. In *Viral Gene Techniques*, vol. 7. K. W. Adolph, ed. Academic Press Inc, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, p. 13-30.
31. **Bett, A. J., W. Haddara, L. Prevec, and F. L. Graham.** 1994. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8802-8806.
32. **Aarden, L. A., E. R. De Groot, O. L. Schaap, and P. M. Lansdorp.** 1987. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *European Journal of Immunology* 17:1411-6.
33. **Baumann, H., C. Richards, and J. Gauldie.** 1987. Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells. *Journal of Immunology* 139:4122-8.
34. **Gauldie, J., C. Richards, W. Northemann, G. Fey, and H. Baumann.** 1989. IFN beta 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 557:46-58; discussion 58-9.
35. **Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Kohler.** 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368:339-42.
36. **Xing, Z., Y. Ohkawara, M. Jordana, F. L. Graham, and J. Gauldie.** 1996. Transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene to rat lung induces eosinophilia, monocytosis, and fibrotic reactions. *J Clin Invest* 97:1102-1110.

37. **Hirota, H., K. Yoshida, T. Kishimoto, and T. Taga.** 1995. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4862-6.
38. **Yoshida, M., J. Sakuma, S. Hayashi, K. Abe, I. Saito, S. Harada, M. Sakatani, S. Yamamoto, N. Matsumoto, Y. Kaneda, and T. Kishimoto.** 1995. A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9570-9574.
39. **Peters, M., S. Jacobs, M. Ehlers, P. Vollmer, J. Mullberg, E. Wolf, G. Brem, K. H. M. Zumbuschfeld, and S. Rosejohn.** 1996. 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* 183:1399-1406.
40. **Crystal, R. G., N. G. McElvaney, M. A. Rosenfeld, C. S. Chu, A. Mastrangeli, J. G. Hay, S. L. Brody, H. A. Jaffe, N. T. Eissa, and C. Danel.** 1994. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis [see comments]. *Nature Genetics* 8:42-51.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Influence of an elevation of rsIL-6R on turpentine induced CPI production

Animals (n=6) were injected simultaneously with 150 µl of turpentine s.c. and either Ad5.E1.rsIL-6R (dark bar) or Ad5.E1.Dl (light bar) (10^9 p.f.u., i.p.). Blood was drawn every 24 hours for 7 days and serum CPI level determined by immuno electrophoresis. Normal CPI level is defined by level in non challenged animals. Results are expressed as mean +/- standard deviation.

Figure 2: Influence of an elevation of rsIL-6R on turpentine induced CPI production

Animals (n=6) were injected simultaneously with Ad5.E1.mIL-6 and either Ad5.E1.rsIL-6R (dark bar) or Ad5.E1.Dl (light bar) ($5 \cdot 10^8$ p.f.u., i.p.). Blood was drawn every 24 hours for 7 days and serum CPI level determined by immuno electrophoresis. Normal CPI level is defined by level in non challenged animals. Results are expressed as mean +/- standard deviation.

Figure 3: Kinetics of *in vivo* rsIL-6R expression

Rats (n=3 in each group) were injected intra tracheally with Ad5.E1.rsIL-6R (dark bar) or Ad5.E1.Dl (light bar) (10^9 p.f.u.), broncho-alveolar lavages were collected at different time points and rsIL-6R concentrations were determined with a specific ELISA. Results are expressed as mean +/- standard deviation.

Figure 4 Histological Pictures (in preparation)

Figure 1

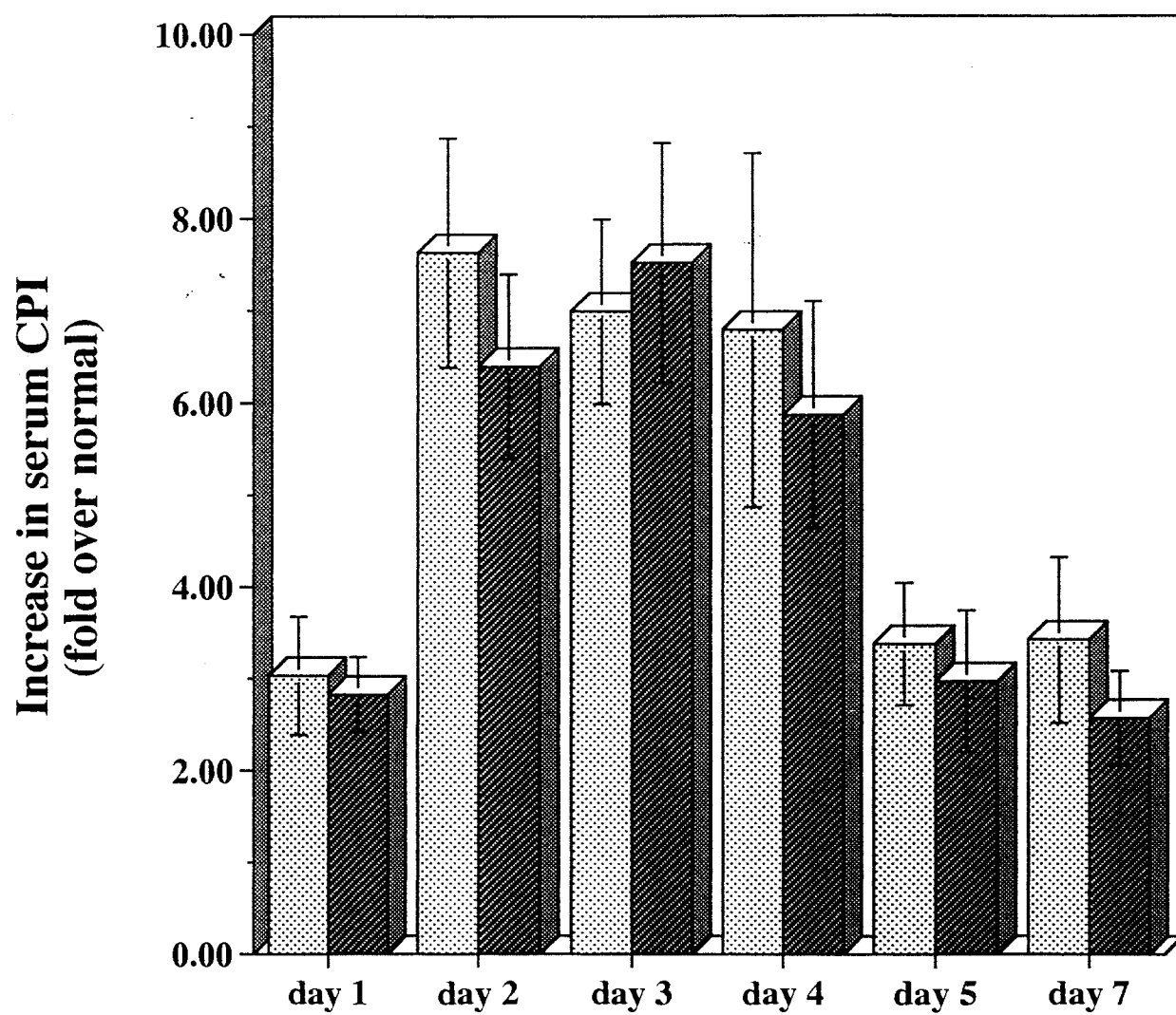


Figure 2

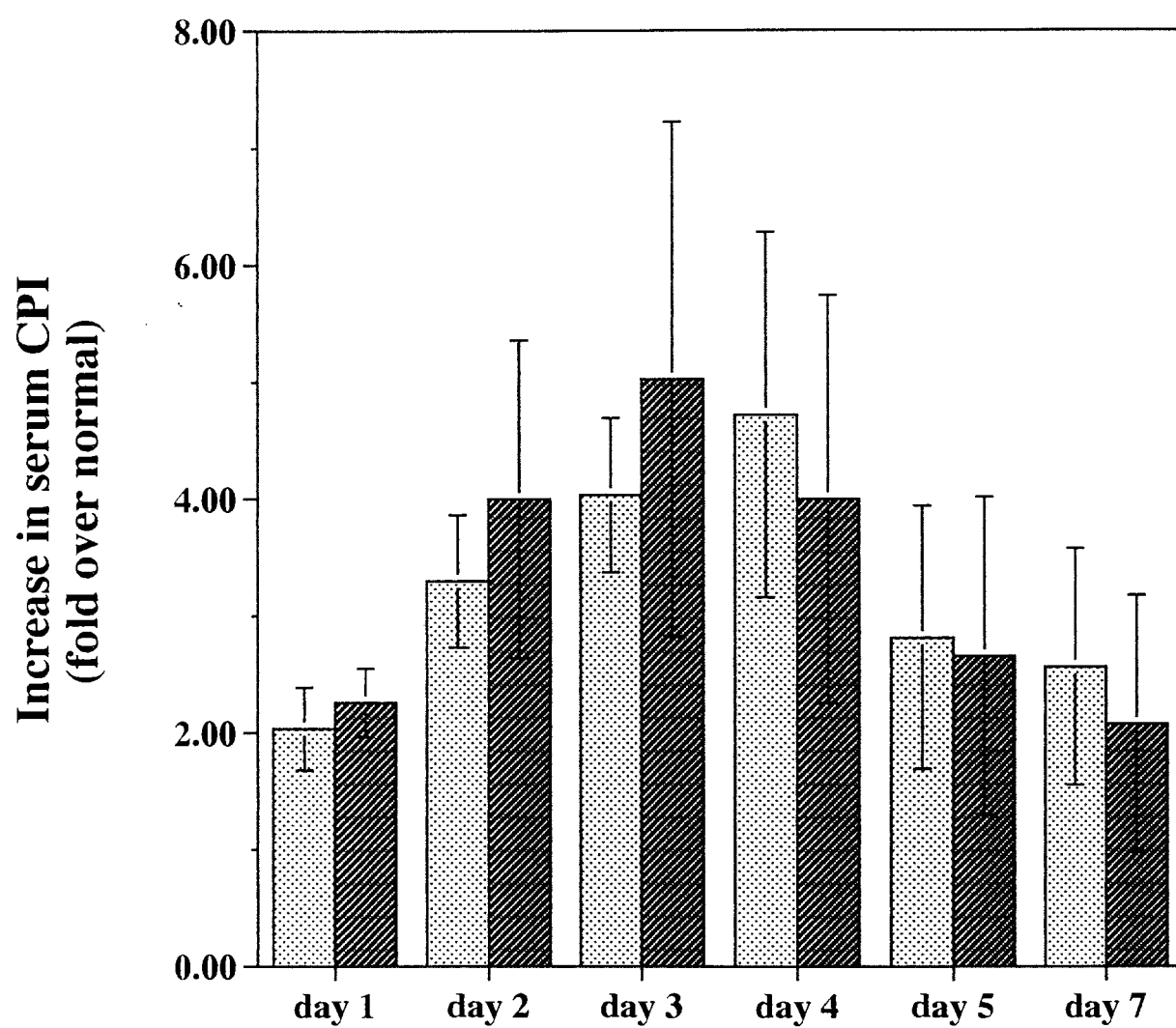


Figure 3

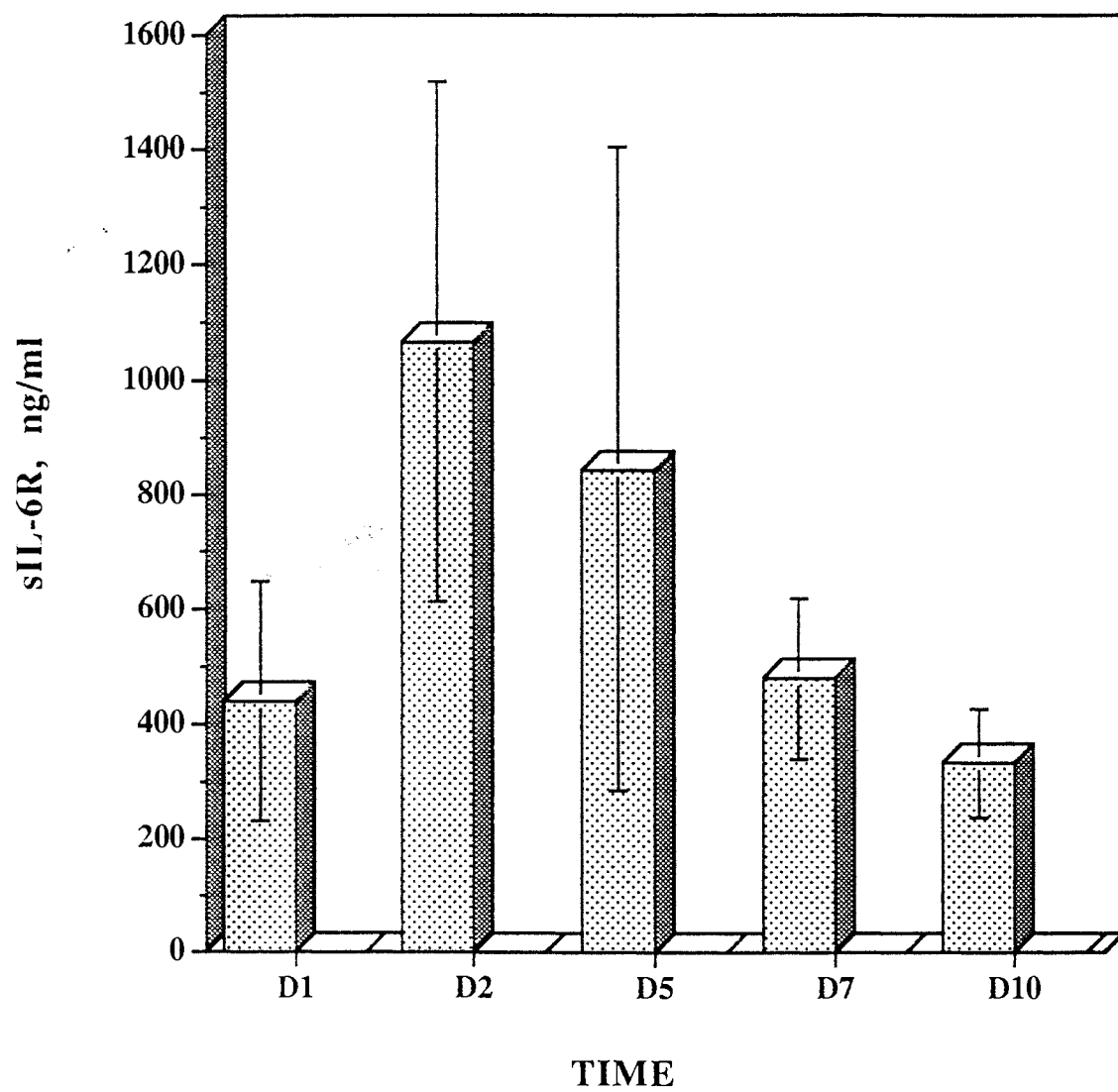


Figure 4 **Histological Pictures (in preparation)**

9. QUATRIEME ARTICLE

(Soumis pour publication à la revue "FEBS Letters")

L'adénovirus recombinant s'est révélé être un très bon vecteur pour générer une réponse immune contre le transgène. L'administration de Ad5.rsIL-6R chez le lapin nous a permis d'obtenir des anticorps spécifiques contre le récepteur soluble. Nous avons testé ces anticorps sur différentes cellules afin de déterminer quelle était leur influence sur des mécanismes IL-6 dépendants. Alors que ces anticorps se révèlent être fortement antagonistes sur les cellules HepG2, H35, NIH 3T3 ou des fibroblastes pulmonaires de rat (RLF) par inhibition spécifique de l'interaction de l'IL-6 et de son récepteur, ils possèdent une activité fortement agonistes sur les cellules B9, provoquant une prolifération très semblable à celle induite par l'IL-6. Ce phénomène sur les cellules précédemment citées est bien du à une réaction spécifique de l'anticorps sur le récepteur puisque les effets "IL-6 like" induits par l'oncostatin-M ne sont pas affectés et que des fragments Fab générés à partir des IgG spécifiques conservent leur activité antagonistes. Par opposition, les cellules B9 fortement stimulées par les IgG, voient leur prolifération totalement bloquées par les fragments Fab. Ces résultats suggèrent que les IgG en induisant une dimérisation du récepteur peuvent induire un signal prolifératif intracellulaire. Ces expériences ont d'ailleurs été confirmées par l'étude de l'activation des protéines STAT intracytoplasmiques; les IgG bloquent la stimulation des protéines STAT par l'IL-6 sauf dans les cellules B9 où elles induisent une augmentation de celles-ci; les fragments Fab bloquent toute stimulation IL-6 dépendante.

Un nouveau mécanisme impliquant uniquement la dimérisation du récepteur à l'IL-6 ou gp80 peut induire la prolifération des cellules B9.

**Antibodies to Rat Soluble IL-6 Receptor Stimulate
B9 Hybridoma Cell Proliferation**

Vincent Thibault, Carl D. Richards, Fernando Bothelo and Jack Gauldie

Running Title: Anti-IL-6R stimulates B9 cells directly

Address correspondence: Dr. J. Gauldie, Professor and Chairman, Department of Pathology, Health Sciences, Center, McMaster University, 1200 Main Street West, Hamilton, Ontario, Canada, L8N 3Z5.

SUMMARY

Interleukin-6 mediates its pleiotropic effects by interacting with its membrane bound receptor (gp80) or its soluble counterpart gp54 as long as the transducer protein gp130 is present at the cell surface. Although not completely elucidated, the IL-6 signaling pathway involves, first, dimerization of gp130 proteins, then activation of Jak proteins (Jak 1, 2 or Tyk 2) that are involved in gp130 phosphorylation and therefore STAT (STAT-1 and-3) recruitment. Dimers of STAT protein are then translocated into the nucleus and bind to specific responsive element. Other pathways may also be activated. Using a recombinant adenovirus expressing the extracellular domain of IL-6 receptor, we have generated antibodies against the rat soluble IL-6 receptor (rsIL-6R) in rabbits. By Western blot analysis we show that those antibodies react specifically with recombinant rsIL-6R from different expression system and inhibit IL-6 induced acute phase proteins synthesis in rat (H35) or human (HepG2) hepatoma cells without affecting Onco-M stimulation. Conversely, on B9 cells, specific IgG show a potent stimulatory activity with a dose response proliferation close to the one induced by IL-6. Fab fragments abrogate IL-6 induced hepatoma cell stimulation and B9 cell proliferation. We have analyzed the signal transduction pathway induced by specific sIL-6R IgG or IL-6. A potent activation of STAT-3 was detected in IgG or IL-6 stimulated B9 cells whereas in H35, NIH 3T3 and M1 cells only IL-6 could trigger a similar STAT activation. Our data implicate that the IL-6 receptor system and its activation must be different depending on the cell type and that the mere dimerization of gp80 might be sufficient to promote STAT activation and B9 cell proliferation.

INTRODUCTION

Interleukin-6 (IL-6) belongs to the family of hematopoietic cytokines that includes Oncostatin-M (OSM), Interleukin-11 (IL-11), Leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF) and cardiotropin-1 (CT-1) (for review see (1, 2)). These cytokines share various activities since they act at receptor complexes that include the common signal transducer glycoprotein, gp130. The IL-6 receptor complex includes the unique ligand-binding IL-6 receptor chain (IL-6R). IL-6 interacts first with membrane bound IL-6R or its soluble counterpart (sIL-6R), and this primary complex interacts with gp130. Interaction of the IL-6/IL-6R complex with gp130 is mandatory since the intracellular domain of IL-6R is very short and incapable of signaling alone. Recent work indicates the formation of an hexameric complex involving two molecules each of IL-6, IL-6R or sIL-6R and gp130 (3, 4). Where IL-11 appears to utilize a similar system, for other gp130 cytokines (CNTF, OSM, CT-1 or LIF), the presence of gp130 and the LIF binding protein (LIFR) is necessary in order to transduce the signal. Analysis of the cytoplasmic region of gp130 has shown the presence of at least three different regions involved in signal transduction, but the absence of any intrinsic catalytic domains. Activation of associated tyrosine kinases of the Janus kinase (Jak) family, including Jak 1, Jak 2 and Tyk 2, have been implicated in IL-6 signal transduction depending upon the cell types (for review see (5, 6)). In the IL-6 pathway, JAK kinases are found associated with gp130 in the membrane proximal cytoplasmic region, and IL-6-induced dimerization of gp130 activates Jak 1 which phosphorylates several tyrosine residues along gp130. This allows recruitment, through the SH2 domain, of members of the Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family, namely STAT 1 and STAT 3, which also become phosphorylated by the Jak bound to gp130 (7, 8). Upon phosphorylation of their SH2 domain proximal tyrosine, STATS form hetero- and homo-dimers and translocate to the nucleus where they behave as transcriptional factors and bind to specific promoter sequences upstream of IL-6 induced genes such as APR-RE and NF-IL-6RE (9, 10). It is noteworthy that other pathways, other than the one described above are involved in IL-6 signal transduction (11-14). The link between the other pathways and gp130 remains incompletely defined.

Recent work from Baumann and others have described functions of different regions of the

gp130 intracellular domain (8, 15-17). Box 1 and 2 (the closest to the membrane) appear responsible for the binding of Jak, and box 3 (closer to the carboxy terminus) is important for the binding of STAT proteins and therefore critical for events leading to gene transcription. Lastly, box 4 is at the very carboxy end of gp130, and seems important for differentiation process.

The presence of the soluble IL-6 receptor has been shown to enhance responses to IL-6 in hepatocytes and in other cells that possess gp130 but not the membrane IL-6R form (18-23). This is in contrast to the action of other soluble receptors which inhibit ligand function (24, 25). In order to specifically inhibit biological responses mediated by the IL-6 receptor in rat cells in vitro and in vivo, we generated specific antibodies to the rat IL-6 soluble receptor. In this paper we show that polyclonal antibodies against rat sIL-6R but can specifically inhibit IL-6 induced acute phase protein stimulation in hepatocytes. The antibody also inhibits IL-6-induced STAT activation in rat hepatocytes, mouse M1 and NIH3T3 cells. In contrast, the antibodies possess a potent agonistic activity on B9 cell proliferation and can activate STAT proteins in B9 nuclear extracts. Purified specific Fab fragments, on the other hand, inhibit B9 proliferation and STAT activation. These studies have raised several issues regarding qualitative differences between B9 cells and other IL-6-responsive cells within these model systems.

MATERIAL AND METHODS

Cell treatment and analysis of acute phase protein production: the effects of cytokines or antibody on human HepG2 and rat H35 hepatoma cells was determined on confluent monolayer cells in 24 well cluster plate containing 300 µl of media. Cells were stimulated for 48 hours, media was removed and the concentrations of acute phase proteins were analyzed by rocket immunoelectrophoresis using specific antibody containing agarose as previously described (26).

B9 cell proliferation assay.

The B9 hybridoma proliferation assay was performed as previously described and analyzed using a colorimetric development (27, 28).

Antibody and cytokines. Specific antibodies against the rat soluble interleukin-6 receptor were generated in rabbits immunized with a replication deficient recombinant adenovirus as previously described (Thibault et al manuscript submitted). Fab fragments were generated using immobilized papain (Pierce Biochemicals) according to manufacturer's instructions. Fc fragments were eliminated by chromatography on a protein A column (Pharmacia). Rat IL-6 was produced in *E. coli* and affinity purified on a Ni chelate column as previously described (29). hIL-6 and OSM are generous gifts from Dr. M. Widmer (Immunex Corp. Seattle, WA) and Dr. P. Wallace (Bristol-Myers Squibb Research Institute Seattle, WA), respectively.

Gel shift assay: Cells were treated with cytokines and/or antibody as indicated for 15 minutes. Nuclear extracts were prepared as described previously (30). Oligo nucleotide probes corresponding to the high affinity sis-inducible element SIE (31) were annealed, labeled and purified (sequences are: 5'-GTCGACATTTCCCGTAAATC-3' and 5'-TCGACGATTACGGGAAATG-3'). For the assay, nuclear extracts were incubated for 15 minutes on ice with 2µg of poly (dI.dC) and 5µg of calf thymus DNA in binding buffer as described. Probe (2×10^5 cpm) was added and the reaction was incubated 20 minutes at r.t. Loading buffer was added, and samples were electrophoresed (5% polyacrylamide) at 95V for 4 hours. The gels were then dried before auto radiography.

Western Blot: Proteins were run on a 7.5 or 10% polyacrylamide gel under reducing conditions. The gels were transferred onto a nitrocellulose membrane (Immobilon). After blocking for one hour into 5% blotto, 1% BSA, Tween 1 %-PBS, the antibodies were added

to a dilution of 1/5,000 in the same solution. Development was carried out with a secondary antibody (goat anti rabbit, SIGMA) labeled with peroxidase and a chemiluminescence system (Dupont-NEN) according to manufacturers specification.

RESULTS

-Antibodies raised against rat sIL-6R react specifically with recombinant rat IL-6R produced in *E. coli*, insect cells or human cells.

Specific antibodies were raised in rabbits by vaccination with a recombinant adenovirus expressing the extra- cellular domain of rat IL-6R (Thibault et al manuscript submitted) and boosting with baculovirus expressed purified protein. Standard SDS-PAGE (10%) under denaturing conditions was used to separate different preparations of rat sIL-6R expressed either in *E. coli*, in insect cells by the means of a recombinant baculovirus (26) or in different human or rodent cells infected with recombinant adenovirus. A Western blot shows clearly the specific reactivity of this antibody with a 33 kDa protein from *E. coli* (lane 1), with a 50 kDa protein in the case of baculovirus produced material (lane 2) and with a 55 kDa expressed from the adenovirus vector in human or rat cells (lanes 3 to 5) (fig. 1). Lanes 4 and 6 show HepG2 or H35 cell supernatants infected with control virus and indicate no reactivity. The difference in size of materials detected is explained by the non-glycosylation seen in prokaryotic cells and the different type of post-transcriptional modification between insect and eukaryotic cells.

Anti-rat sIL-6R inhibits IL-6 induced acute phase response but does not modify OSM response.

Antibodies against rat IL-6R were tested for effects on cytokine-induced acute phase protein response of rat H35 and human HepG2 hepatoma cells. Briefly, subconfluent cells in 24 well plates were stimulated with human IL-6, rat IL-6 or human OSM in the presence of either specific IgG against rat IL-6R, purified specific Fab fragments of this antibody or control IgG isolated from non-immune rabbit serum. After two days, we analyzed the supernatants to measure acute phase protein concentrations. We first show that increasing concentrations of anti-rat IL-6R specific IgG inhibit IL-6 induced CPI production from H35 cells in a dose dependent manner (fig. 2a). In H35 cells, even at low concentration, i.e. 7.8 µg/ml, we could inhibit more than 20% CPI production induced with 2 µg/ml rat IL-6. At 63 µg/ml, which represents a 1/100 dilution of our IgG preparation, we obtained a 61% inhibition, something very similar to that seen with a neutralizing anti-rat IL-6 specific antibody at this IL-6 concentration. A similar inhibitory effect was seen when acute phase protein production was induced with human IL-6. 63 µg/ml anti-rat IL-6R specific IgG inhibited 85% of CPI production induced with 100ng/ml hIL-6. Neither control IgG nor specific anti-rat sIL-6R IgG modified the spontaneous synthesis of acute phase proteins and control IgG had no influence on IL-6 induced CPI production.

In order to better characterize the specificity of this effect, we analyzed CPI production in H35 cells that were stimulated with 50 ng/ml of Oncostatin M in presence of specific or control IgG (fig. 2b). Use of inhibitory concentrations of specific IgG (63 µg/ml) did not modify OSM induced CPI production, implying the antibody was acting at the IL-6R gp80 level and not on the gp130 transducer protein.

In order to rule out a nonspecific effect of IgG molecules at the cell surface, we generated Fab fragments of the anti-rat sIL-6R by papain cleavage of specific IgG. Within the same concentration range as for the whole IgG molecules, purified Fab fragments (24 µg/ml) showed a similar dose dependent inhibitory effect on rat IL-6 induced acute phase protein production (fig. 2b). Similar experiments carried out on human cells (HepG2) did not show

any inhibitory action of the anti-rat sIL-6R on human IL-6 induced acute phase protein responses.

Anti-rat sIL-6R specific IgG can induce proliferation of B9 cells.

We tested the antibodies for inhibition of IL-6 dependent B9 hybridoma cell proliferation. B9 cells were incubated with increasing concentrations of specific IgG. Surprisingly, and contrary to what we observed on rat hepatoma cells, specific anti-rat sIL-6R IgG alone showed a strong agonistic effect (fig. 3). As low as 1 ng of specific IgG could induce B9 cell proliferation with maximum proliferation induced with 300 ng. The dose response curve was very alike to an IL-6 response curve with similar maximum values. By comparison, 20 ng of specific IgG could induce proliferation equal to that seen with 1U of IL-6.

Anti-rat sIL-6R specific Fab fragments inhibit both IL-6 induced acute phase protein production and B9 cell proliferation

To verify the hypothesis that the antibody was acting through specific interaction with IL-6 receptors on the cell surface, we looked at the effects of Fab fragments on B9 (and H35 cells). In contrast to specific IgG, specific Fab had no detectable effect on proliferation. When B9 cells were incubated in presence of 2 U of IL-6, increasing concentration of Fab fragments were highly inhibitory of IL-6 induced proliferation (fig. 4), similar to inhibitory effects of Fab fragments on CPI production by H35 cells (Figure 2b). This experiment confirmed the interaction of specific IgG with IL-6R. The effect was dose dependent as was the IgG stimulatory activity (data not shown).

Anti-rat sIL-6R interferes with IL-6 induced STAT activation.

To analyze whether specific IgG against rat sIL-6R was acting upon the IL-6R/Jak/STAT pathway or a different mechanism, we examined the activation of STAT proteins in nuclear extracts of stimulated cells. IL-6 stimulation of B9 cells induced a strong activation of STAT binding activity as shown by gel shift assay (fig. 5). Lane 4 (human IL-6, 400U/ml)

and 5, 6, 7 (16, 1, 0.25 U/ml respectively of rat IL-6) show a dose-dependent induction obtained with specific bands for STAT-3 homodimers detected. In the presence of specific IgG anti-rat sIL-6R alone (Lanes 2 and 3, 63 and 126 µg/ml of IgG respectively), STAT dimerization was strongly induced in B9 cell extracts, to an extent similar to that seen with high concentrations of IL-6. In contrast, stimulation of B9 cells with IL-6 in the presence of anti-rat sIL-6R Fab fragments dramatically decreased IL-6 induced STAT activation. In this case, B9 cells were incubated with 16 U/ml of rat IL-6 and 65 µg/ml of specific Fab fragments, as a result, STAT3 activation was markedly reduced. The same amount of Fab fragment inhibited approximately 80% proliferation. The level of activation of STAT 3 corresponds roughly to the activation induced by 0.2 U of IL-6; the decrease of proliferation is therefore proportionate to the decrease of STAT 3 activation.

We examined STAT activation in H35 cells (figure 6) and found that IL-6 induced high amounts of STAT binding to the SIE probe at 15 minutes after stimulation. Treatment with the specific antibody to sIL-6R alone did not alter levels of signal, however in combination with IL-6, the antibody dramatically inhibited STAT activation as did the Fab fragments. We also tested the action of the antibody on other IL-6-responsive mouse cell lines, including the myeloid leukemia cell line M1, and an embryonic fibroblast cell line N1H-3T3. In both cell types, IL-6 induced marked STAT activation, and inclusion of the specific antibody inhibited the IL-6 effect. The antibody alone was again without detectable effects on STAT. In contrast, shown in the top left panel of Fig. 6, a parallel experiment with B9 cells shows STAT activation by antibody alone, and augmentation of STAT binding with both IL-6 and the antibody.

DISCUSSION

We have generated specific antibodies against rat soluble IL-6 receptor, which recognize specifically the receptor as demonstrated by the detection of a single band on Western blot when reacted with sIL-6R from *in vivo* samples or crude culture supernatants (fig. 1). Since the antibody was generated against the soluble part of the receptor, it can cross-react with the membrane bound counterpart. Our experiments on H35 hepatoma cells clearly demonstrate the ability of specific IgG directed against rat sIL-6R to block IL-6 induced acute phase protein production, cysteine protease inhibitor (CPI), which is highly induced by IL-6 in rat hepatoma cells. By interacting with gp80, we expected specific IgG would compete with IL-6 and therefore prevent any IL-6 mediated event. Figure 2 shows that IL-6 mediated CPI production is partially or completely blocked, depending on Ab and IL-6 concentrations. Owing to the multichain nature of the receptor, we confirmed the absence of cross reaction with the transducer protein, gp130. OSM has been recently shown to act through at least two different receptor complexes, the LIF receptor (LIFR) and the specific Oncostatin M receptor (OSMR) (32, 33). If the Ab inhibitory effect was mediated through a non-specific interaction with one other member of the IL-6R complex, it would necessarily interfere with OSM-mediated stimulation. This was not the case as seen in Figure 3. A non-specific effect of our Ab on acute phase protein production was also ruled out by the absence of effect of the Ab alone, as well as the absence of any effect on human HepG2 cells. Human and rat receptors share little homology and the absence of cross reactivity was predicted (34). Non-specific effects could also result from interaction with the Fc portion of IgG molecules. Experiments using Fab fragments isolated from purified IgG, confirmed a specific effect due to the reactivity of specific epitopes of gp80 (Fig. 2).

As a second IL-6 dependent cell response, we looked at IL-6 induced B9 cell proliferation. As it is now well established, IL-6 by interacting with its specific receptor induces B9 cell proliferation. Contrary to expectations, specific antibodies directed against gp80 induced a dramatic proliferation similar to that induced by IL-6. As a matter of fact, the Ab dose response proliferation followed the IL-6 one and, it is probable that the proliferation signal is induced through the same receptor. As little as 10 ng/ml of Ab could induce a proliferation

and 500 ng/ml was enough for maximal proliferation. Even though it was very unlikely, the presence of any contaminating IL-6 in the IgG preparation was ruled out by the lack of activity of the antibody on H35 cells at much higher concentrations ($>10\text{ }\mu\text{g/ml}$). Contrary to this unexpected effect, Fab fragments did not induce any proliferation but rather inhibited the IL-6-induced effect in dose-dependent fashion. Recent studies have shown that in human cells, cross linking of gp130 with a specific antibody can induce JAK kinase and biologic responses in HepG2 cells and hematopoietic cells (35). We suggest that in B9 cells treated with specific anti-rat sIL-6R, two molecules of gp80 are cross-linked sufficiently to induce activation of Jak kinase(s) and subsequent STAT activation and a proliferation signal. Fab fragments, on the other hand, exhibit monovalent reactivity with antigen, cannot induce homodimerization and therefore block the ligand site and any IL-6 induced proliferation.

Interestingly, this apparently does not occur in other IL-6 responsive cells including H35, NIH-3T3 and M1 cells where specific IgG inhibited STAT activity. Since IgG anti sIL-6R reacts specifically with gp80 and not with gp130, our experiments imply either that gp80, at least on B9 cells, are pre-associated with gp130 free of IL-6 or with a residual amount of ligand already bound to it. Alternatively, or binding of IgG to gp80 induces a conformational change allowing for the binding of gp80 with gp130. We and others have previously noted the possibility that B9 cells can secrete low amount of IL-6 explaining proliferation activity of recombinant sIL-6R by itself without addition of exogenous IL-6 (22, 23, 26). Thus, B9 cells can in presence of high amount of sIL-6R, develop an autocrine growth loop owing to residual secretion of IL-6. This sIL-6R activity has not been reported for other cell lines and it is therefore very likely that the B9 cell IL-6R/gp 130 system differs slightly from that described for other cell lines. Our hypothesis focuses both on the IL-6R/gp130 ratio in those different cell lines, and the absolute number of IL-6R present at the surface with possible IL-6 secretion. Our findings can be compared to those from Biro et al. who reported agonistic activities of receptor domain (WSEWS) specific monoclonal antibodies on HepG2 cells (36). Even though this motif is found on both gp80 and gp130, the hypothesis of an antibody mediated dimerization of gp130 is still valid. If our hypothesis is true, it would fit with the concept of Jak kinases being pre-associated with gp130; thus, bringing together two gp130 and the Jak associated kinases would induce STAT activation and a proliferation signal. The

difference between B9 cells and the other cells tested could simply be the gp130 associated kinases which, owing to a conformation specificity, may not be brought together except in B9 cells. The different Jak kinases being used in the IL-6 signaling pathway have already been demonstrated by several authors (7, 13, 14, 37-39). Alternatively other pathways may be involved that could induce B9 cell proliferation. For instance we can imagine that STAT proteins are not directly responsible for B9 proliferation but another pathway, such as MAP kinases, could be triggered after Jak phosphorylation (11).

In summary, we have shown that specific IgG directed against IL-6R were able either to induce a proliferation signal in B9 cells through activation of the JAK / STAT pathway, or to block any IL-6 stimulation in other cells tested. Although we ruled out species differences, the precise mechanisms remain unknown. This work is important for pathologies associated with immune dysregulations. In fact, in multiple myeloma where hematological disorders are present, occurrence of an antibody that could possibly stimulate leukemic cell proliferation would be highly relevant (40, 41).

BIBLIOGRAPHY

1. **Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga.** 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. [Review]. *Blood* 86:1243-54.
2. **Pennica, D., K. J. Shaw, T. A. Swanson, M. W. Moore, D. L. Shelton, K. A. Zioncheck, A. Rosenthal, T. Taga, N. F. Paoni, and W. I. Wood.** 1995. Cardiotrophin-1 - Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor gp130 signaling complex. *J Biol Chem* 270:10915-10922.
3. **Ward, L. D., G. J. Howlett, G. Discolo, K. Yasukawa, A. Hammacher, R. L. Moritz, and R. J. Simpson.** 1994. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *Journal of Biological Chemistry* 269:23286-9.
4. **Paonessa, G., R. Graziani, A. De Serio, R. Savino, L. Ciapponi, A. Lahm, A. L. Salvati, C. Toniatti, and G. Ciliberto.** 1995. Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *EMBO Journal* 14:1942-51.
5. **Ihle, J. N., and I. M. Kerr.** 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11:69-74.
6. **Ihle, J. N.** 1995. The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. In *Advances in Immunology, Vol 60, vol. 60*, p. 1-35.
7. **Lutticken, C., U. M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A. G. Harpur, A. F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, and et al.** 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263:89-92.
8. **Stahl, N., T. J. Farruggella, T. G. Boulton, Z. Zhong, J. E. Darnell, and G. D. Yancopoulos.** 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267:1349-1353.
9. **Kishimoto, T.** 1994. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells* 12 Suppl 1:37-44; discussion 44-5.
10. **Lutticken, C., P. Coffer, J. P. Yuan, C. Schwartz, E. Caldenhoven, C. Schindler, W. Kruijer, P. C. Heinrich, and F. Horn.** 1995. Interleukin-6-induced serine phosphorylation of transcription factor APRF: Evidence for a role in interleukin-6 target gene induction. *FEBS Lett* 360:137-143.
11. **Kumar, G., S. Gupta, S. Wang, and A. E. Nel.** 1994. Involvement of Janus kinases, p52shc, Raf-1, and MEK-1 in the IL-6-induced mitogen-activated protein kinase cascade of a growth-responsive B cell line. *Journal of Immunology* 153:4436-47.

12. **Boulton, T. G., Z. Zhong, Z. Wen, J. E. Darnell, Jr., N. Stahl, and G. D. Yancopoulos.** 1995. STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6915-6919.
13. **Matsuda, T., M. Takahashitezuka, T. Fukada, Y. Okuyama, Y. Fujitani, S. Tsukada, H. Mane, H. Hirai, O. N. Witte, and T. Hirano.** 1995. Association and activation of Btk and tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. *Blood* 85:627-633.
14. **Matsuda, T., T. Fukada, M. Takahashitezuka, Y. Okuyama, Y. Fujitani, Y. Hanazono, H. Hirai, and T. Hirano.** 1995. Activation of fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin- 6 family cytokine signal transducer, and their association. *J Biol Chem* 270:11037-11039.
15. **Murakami, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1991. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:11349-53.
16. **Baumann, H., A. J. Symes, M. R. Comeau, K. K. Morella, Y. Wang, D. Friend, S. F. Ziegler, J. S. Fink, and D. P. Gearing.** 1994. Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells. *Molecular & Cellular Biology* 14:138-46.
17. **Baumann, H., D. Gearing, and S. F. Ziegler.** 1994. Signaling by the cytoplasmic domain of hematopoietin receptors involves two distinguishable mechanisms in hepatic cells. *Journal of Biological Chemistry* 269:16297-304.
18. **Yoshida, K., I. Chambers, J. Nichols, A. Smith, M. Saito, K. Yasukawa, M. Shoyab, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1994. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mechanisms of Development* 45:163-71.
19. **Tamura, T., N. Udagawa, N. Takahashi, C. Miyaaura, S. Tanaka, Y. Yamada, Y. Koishihara, Y. Ohsugi, K. Kumaki, T. Taga, and et al.** 1993. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:11924-8.
20. **Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto.** 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58:573-81.

21. **Mackiewicz, A., H. Schooltink, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1992. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *Journal of Immunology* 149:2021-7.
22. **Diamant, M., M. B. Hansen, K. Rieneck, M. Svenson, K. Yasukawa, and K. Bendtzen.** 1994. Stimulation of the B9 hybridoma cell line by soluble interleukin-6 receptors. *Journal of Immunological Methods* 173:229-35.
23. **Gabay, C., P. Silacci, B. Genin, G. Mentha, C. Le Coultre, and P. A. Guerne.** 1995. Soluble interleukin-6 receptor strongly increases the production of acute-phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes. *Eur J Immunol* 25:2378-2383.
24. **Gearing, D. P., C. J. Thut, T. VandeBos, S. D. Gimpel, P. B. Delaney, J. King, V. Price, D. Cosman, and M. P. Beckmann.** 1991. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO Journal* 10:2839-48.
25. **Rose-John, S., and P. C. Heinrich.** 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal* 300:281-290.
26. **Thibault, V., B. Terlain, and J. Gauldie.** 1996. Characterization and biological activities of recombinant rat soluble interleukin-6 receptor. *Journal of Interferon and Cytokine Research (in press)*.
27. **Mosman, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-60.
28. **Aarden, L. A., E. R. De Groot, O. L. Schaap, and P. M. Lansdorp.** 1987. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *European Journal of Immunology* 17:1411-6.
29. **Braciak, T. A., W. Northemann, D. K. Chong, J. A. Schroeder, and J. Gauldie.** 1996. Vector-derived expression of recombinant rat interleukin-6. *Protein Express Purif* 7:269-274.
30. **Richards, C. D., C. Langdon, F. Botelho, T. J. Brown, and A. Agro.** 1996. Oncostatin M inhibits IL-1-induced expression of IL-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by synovial and lung fibroblasts. *J. Immunol.* 156:343-349.
31. **Sadowski, H. B., K. Shuai, J. E. Darnell, Jr., and M. Z. Gilman.** 1993. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors [see comments]. *Science* 261:1739-44.

32. **Gearing, D. P., M. R. Comeau, D. J. Friend, S. D. Gimpel, C. J. Thut, J. McGourty, K. K. Brasher, J. A. King, S. Gillis, B. Mosley, and et al.** 1992. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255:1434-7.
33. **Liu, J., B. Modrell, A. Aruffo, J. S. Marken, T. Taga, K. Yasukawa, M. Murakami, T. Kishimoto, and M. Shoyab.** 1992. Interleukin-6 signal transducer gp130 mediates oncostatin M signaling. *Journal of Biological Chemistry* 267:16763-6.
34. **Baumann, M., H. Baumann, and G. H. Fey.** 1990. Molecular cloning, characterization and functional expression of the rat liver interleukin 6 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 265:19853-62.
35. **Fourcin, M., S. Chevalier, C. Guillet, O. Robledo, J. Froger, A. Pouplardbarthelaix, and H. Gascan.** 1996. gp130 transducing receptor cross-linking is sufficient to induce interleukin-6 type responses. *J Biol Chem* 271:11756-11760.
36. **Biro, J., S. Bosze, F. Hudecz, Z. Nagy, E. Rajnavolgyi, B. Schmidt, E. Rakasz, and A. Falus.** 1995. The effect of WSEWS pentapeptide and WSEWS-specific monoclonal antibodies on constitutive and IL-6 induced acute-phase protein production by a human hepatoma cell line, HEPG-2. *Immunol Lett* 46:183-187.
37. **Berger, L. C., T. S. Hawley, J. A. Lust, S. J. Goldman, and R. G. Hawley.** 1994. Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 202:596-605.
38. **Matsuda, T., and T. Hirano.** 1994. Association of p72 tyrosine kinase with Stat factors and its activation by interleukin-3, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 83:3457-61.
39. **Stahl, N., T. G. Boulton, T. Farruggella, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, and et al.** 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263:92-5.

40. **Brochier, J., E. Legouffe, J. Liautard, J. P. Gaillard, L. Q. Mao, R. Bataille, J. F. Rossi, and B. Klein.** 1995. Immunomodulating IL-6 activity by murine monoclonal antibodies. *Int J Immunopharmacol* 17:41-48.
41. **Klein, B., and H. Brailly.** 1995. Cytokine-binding proteins: stimulating antagonists. [Review]. *Immunology Today* 16:216-20.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Specific IgG recognize different preparations of rsIL-6R

Purified protein or infected cell supernatants (24 hr) were run on a polyacrylamide gel, transferred onto a PVDF membrane, analyzed with specific purified IgG against rat sIL-6R and revealed with a chemiluminescent detection assay. Purified recombinant rat sIL-6R expressed in E.coli (lane 1) or insect cells (lane 2); recombinant adenovirus, expressing rat sIL-6R {Ad5.rsIL-6R (lane 3 and 5), or control virus Ad5.LacZ (lane 4 and 6)} infected cells supernatants {H35 cells (lane 3 and 4) or HepG2 cells (lane 5 and 6)}.

Figure 2: Specific IgG or Fab inhibit IL-6 induced CPI synthesis from H35 cells

A, H35 cells were stimulated for 2 days with 2 µg/ml of rat IL-6, in the presence of increasing amounts of anti-rat sIL-6R (filled box) or anti-rat IL-6 (empty box) IgG and supernatants were analyzed for CPI content. Results are expressed as the mean of 3 different experiments with standard error; B, H35 cells were stimulated with 50 ng/ml of OSM, 100 ng/ml of human IL-6 or 500 ng/ml of rat IL-6 in presence of control IgG (50 µg/ml, empty box), rat sIL-6R specific IgG (32 µg/ml, filled box) or rat sIL-6R specific Fab fragments (50 µg/ml, dotted box). CPI concentration was determined after a 2 day stimulation. Results are expressed as the mean of 3 different experiments with standard error.

Figure 3 : rsIL-6R specific IgG induce B9 cell proliferation

B9 cells were incubated for 72 hours in presence of increasing concentrations of rat IL-6 or rat sIL-6R specific IgG. Proliferation was measured by an MTT assay and read on a spectrophotometer at 570 nm. A representative experiment done in triplicate is shown, results are expressed as mean +/- standard error.

Figure 4 : rsIL-6R specific Fab fragment prevent IL-6 induced B9 cell proliferation

B9 cells were incubated for 72 hours in the presence of 2 U of rat IL-6 in 96 well plates with addition of control IgG or rat sIL-6R specific Fab fragments at increasing concentrations. Results are expressed as percentage of proliferation as compare to cells incubated with similar concentrations of control IgG. A representative experiment is shown.

Figure 5 : STAT activation in B9 cells.

Cells were untreated (lane 1), treated with IgG anti rat sIL-6R (63 µg/ml, lane 2 or 126 µg/ml, lane 3), hIL-6 (400 U/ml, lane 4), rIL-6 (16, 1 or 0.25 U/ml, lanes 5, 6 and 7 respectively) or a combination (lane 8) of rIL-6 (16 U/ml) and Fab anti sIL-6R (30 µg/ml). Gel shift analysis was performed as in materials and methods with SIE probe and nuclear extracts. The gel shifts corresponding to STAT activated complexes are indicated.

Figure 6 : comparison of STAT activation in B9, H35, 3T3-NIH and M1 cells.

Cells were untreated (lane 1), treated with rIL-6, 16 U/ml (lane 2) anti-rat sIL-6R, 63 µg/ml (lane 3) or the combination (lane 4) as indicated. Gel shift analysis was performed as in materials and methods with SIE probe and nuclear extracts. The gel shifts corresponding to STAT activated complexes are indicated.

Figure 1

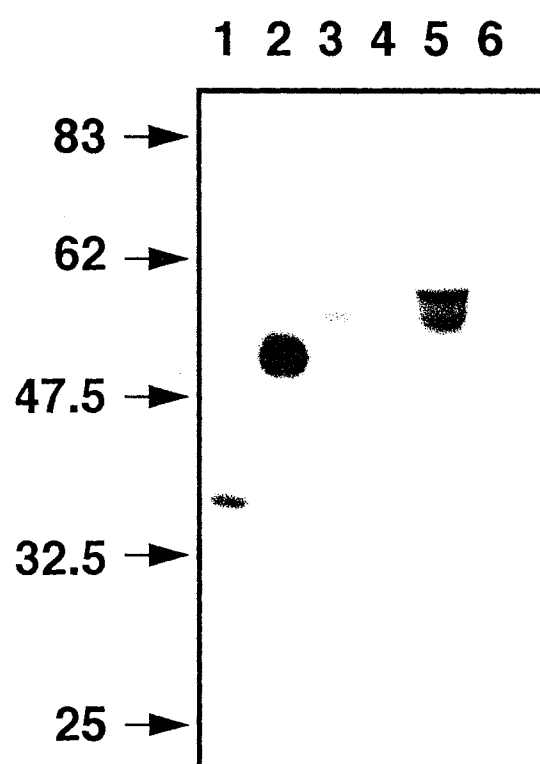
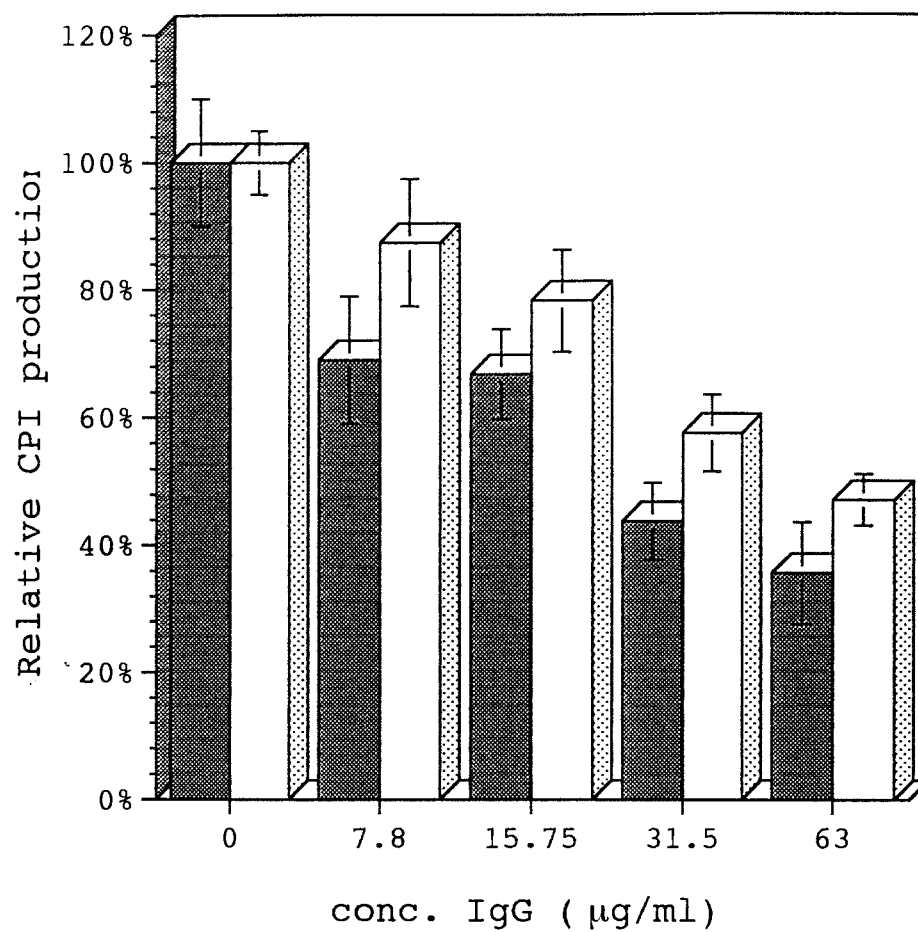


Figure 2

A



B

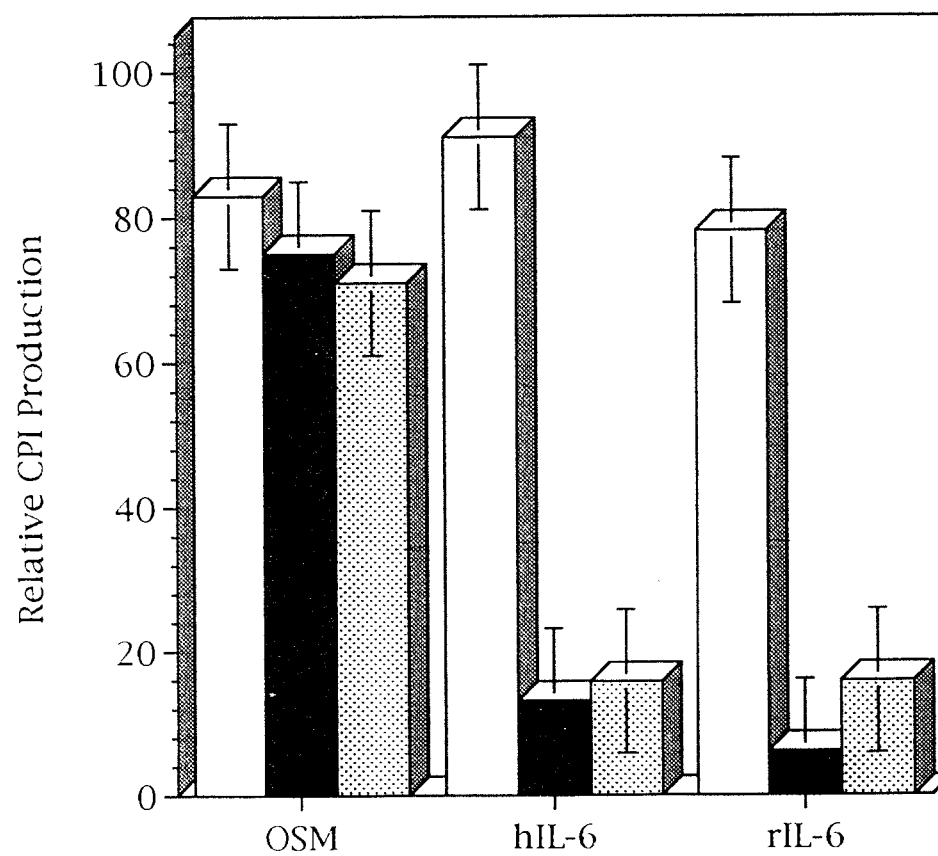


Figure 3

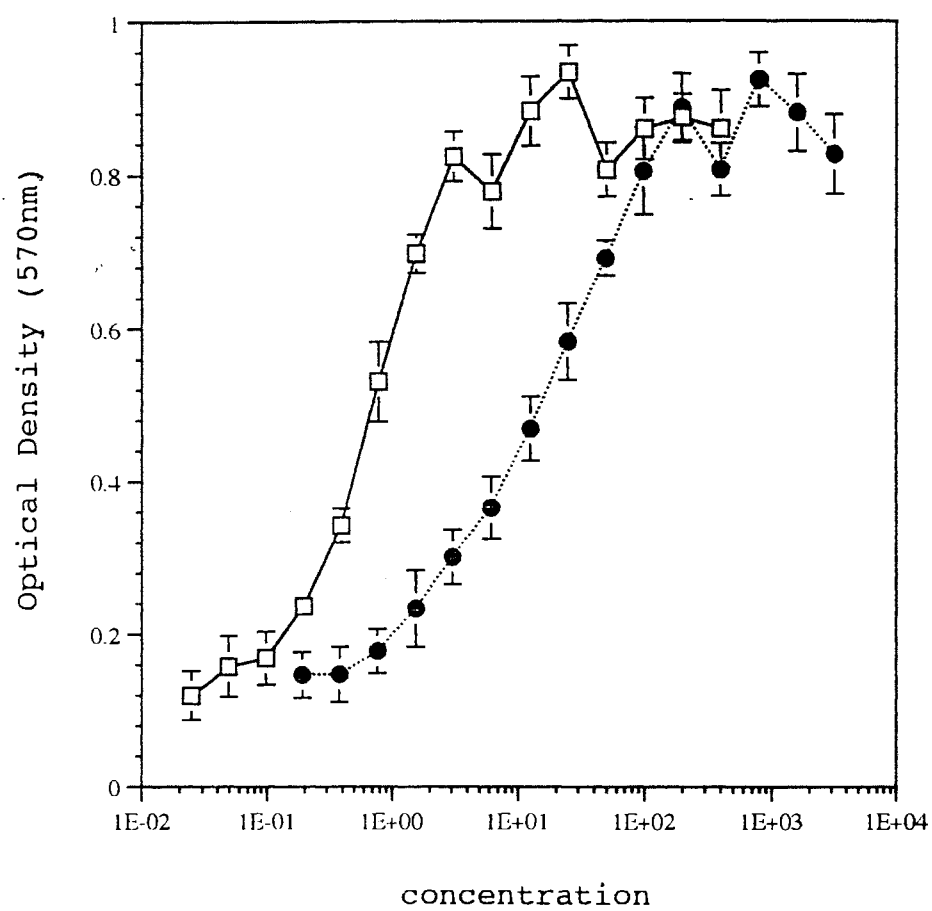


Figure 4

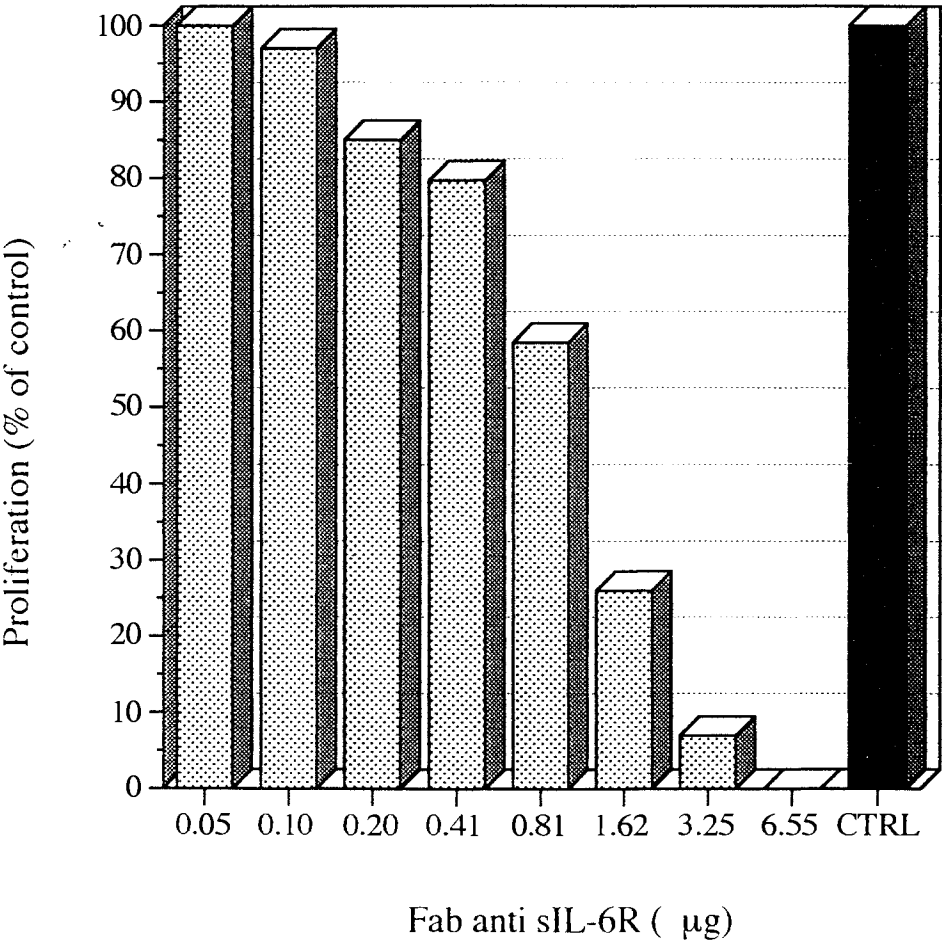


Figure 5

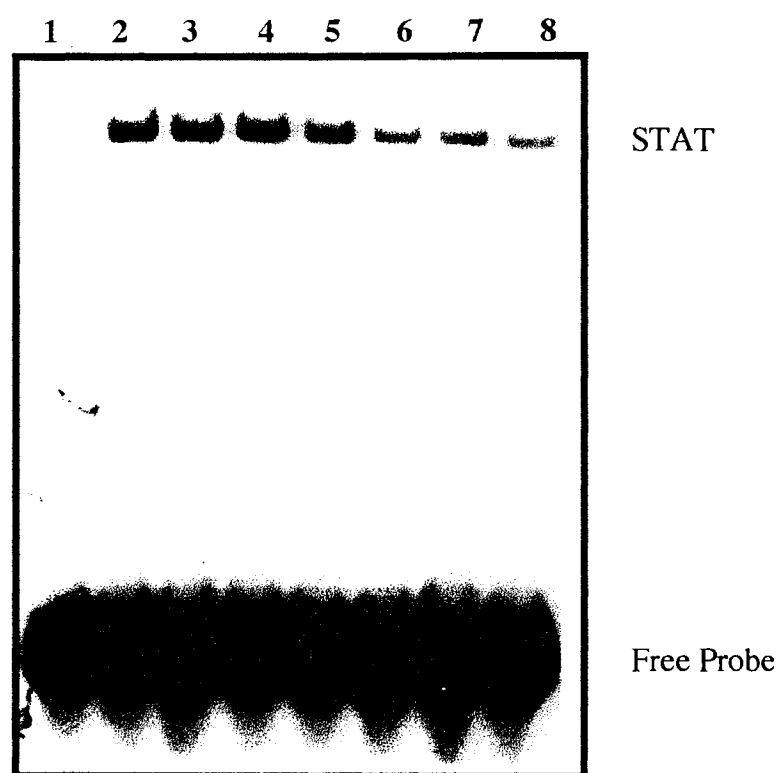
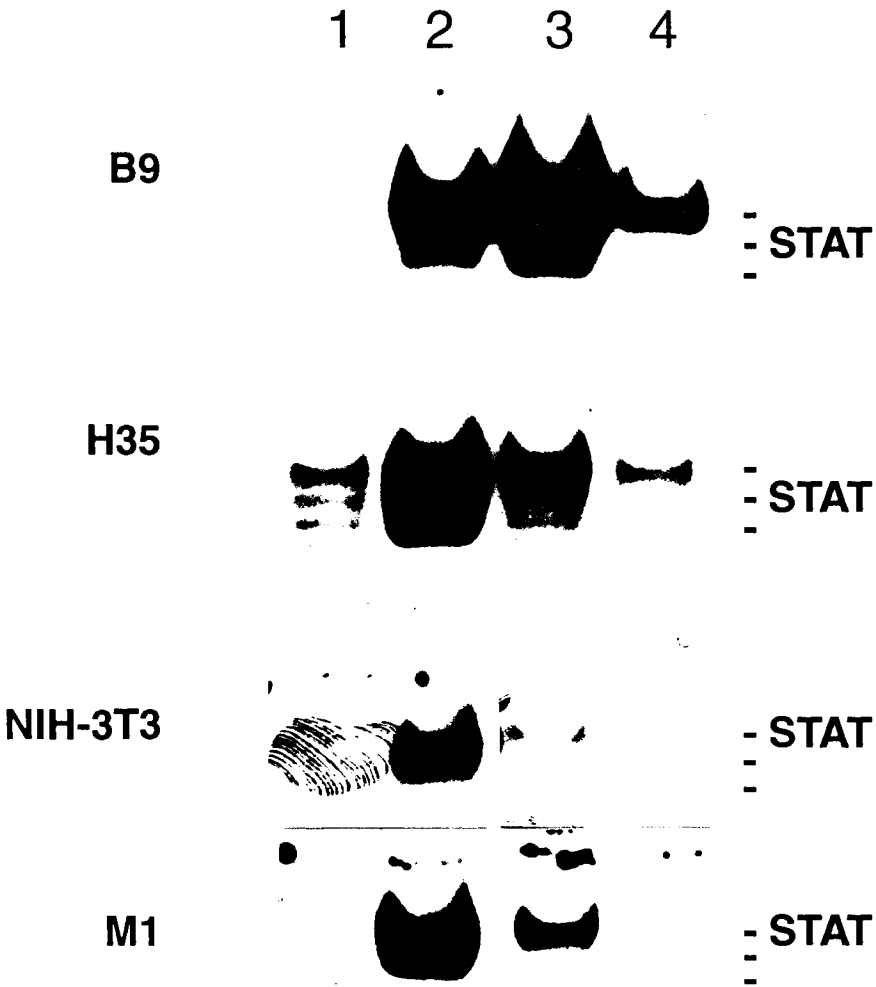


Figure 6



10. DISCUSSION

Le travail que nous venons de présenter soulève un certain nombre de problèmes que nous avons généralement abordés lors des discussions de chaque article mais que nous nous efforcerons de développer dans ce chapitre.

L'ultime but de notre travail étant la mise en place d'un système expérimental chez le rat et l'étude de l'effet du récepteur soluble de l'interleukine-6, nous avons été obligés de développer un certain nombre de réactifs et de techniques nécessaires pour ce modèle. Ainsi la première partie du travail a surtout consisté à caractériser la protéine recombinante.

Notre premier choix a été d'utiliser *E. coli*. Bien que nous n'avons pas présenté de résultats détaillés à ce propos, nous avons tenté d'exprimer la protéine entière (80 kDa, membranaire) mais toutes nos tentatives ont échoué. Cela reflète ce qui a été rapporté par de nombreux auteurs qui ont essayé de produire des protéines transmembranaires dans les systèmes procaryotes. Il semble que la présence d'une région hydrophobe, telle la région intramembranaire, perturbe le repliement tertiaire des protéines. De même il est rare de pouvoir produire dans ces systèmes, tel que, une protéine recombinante de masse moléculaire élevée. Dans notre cas, nous n'avons jamais pu mettre en évidence, par électrophorèse protéique, la production de cette protéine ni dans la cellule ni dans le milieu de culture et ce, quelque soit la souche bactérienne utilisée.

Lorsque nous avons décidé de produire la partie extracellulaire du récepteur à l'IL-6, le problème fut différent puisque la protéine était séquestrée dans les inclusions intracytoplasmiques. Cette compartimentalisation dans *E. coli* est, elle aussi, habituelle des systèmes procaryotes et impose le recours à des techniques de purifications utilisant des réactifs extrêmement stringents. Ainsi, pour lyser les inclusions avons nous du utiliser de l'hydrochlorure de guanidium (6M). La purification, au moyen d'une colonne chargée en nickel, de cette protéine de fusion (comportant 6 histidines en position N terminale) a été très satisfaisante, même en milieu dénaturant, mais c'est au moment de la dialyse que la protéine précipitait, ne laissant qu'une très faible quantité de protéine soluble. Ces problèmes n'ont pu être améliorés ni par le changement de pH ou de la composition ionique du milieu de dialyse,

ni par le changement de la température ou du milieu de culture des bactéries, ou du temps d'incubation précédant l'induction par l'IPTG. Ce n'est qu'après de maints essais que nous avons testé l'efficacité de la présence d'un système rédox (glutathion réduit/oxydé). Cette stratégie nous a finalement permis d'obtenir un rendement de production correct.

Les difficultés rencontrées avec le système procaryote nous ont alors conduit à changer notre stratégie et nous avons opté pour les cellules d'insectes et le baculovirus. Afin de rester dans un système déjà mis au point pour la purification, nous avons conservé le système hexa-histidine/nickel. L'absence d'un vecteur baculovirus commercialisé possédant une séquence induisant la sécrétion protéique (telle pAc.gp67) et une séquence hexa-histidine, nous sommes partis de produits générés par PCR provenant du plasmide utilisé pour *E. coli*. Les résultats montrent un rendement de production très intéressant, supérieur à celui obtenu chez *E. coli* et une simplicité de purification appréciable. L'analyse électrophorétique indique bien la différence de taille due à la glycosylation qui existe dans les cellules d'insectes et non dans les cellules procaryotes.

Tableau 6: Différences entre les protéines produites par *E. coli* et les cellules d'insectes

Différences entre les deux systèmes d'expression		
Système d'expression	<i>E. coli</i>	cellules d'insectes (baculovirus)
Taille	324 AA (32 kDa) (enzymes de restriction)	358 AA kDa (50 kDa) (approche PCR)
Glycosylation	Aucune	Très proche des systèmes eucaryotes
Conformation protéique	Partiellement connue	Conformation native probable
Rendement	2 mg/l	4 mg/l

L'analyse de l'activité biologique n'était pas aussi simple que prévue puisqu'aucun système n'existait chez le rat et que nous ne savions pas quels résultats attendre. Le système original que nous avons développé sur les cellules HepG2, nous a permis de définir avec certitude l'effet propre du récepteur soluble de rat et non son effet au sein d'un milieu déjà riche en protéines interférantes. En effet, les études préalablement réalisées sur des cellules leucémiques murines M1 ne permettent de donner une indication que sur l'interférence des récepteurs solubles sur un effet propre à l'IL-6, la différenciation. L'absence de réponse des cellules HepG2 à l'IL-6 de rat permet, avec des concentrations constantes d'IL-6, de mesurer l'activité biologique du sIL-6R. Ce test fonctionnel nous a permis de conclure que le récepteur produit dans *E. coli* et dans les cellules d'insectes était biologiquement actif à des degrés différents. Ce dernier agit en effet à des concentrations plus basses ce qui reflète probablement une meilleure conformation finale de la protéine (glycosylation et structure tertiaire).

Les résultats généraux avec les protéines exprimés avec les deux systèmes étant identiques, nous ne parlerons que de ceux générés au moyen de la protéine dérivée de baculovirus.

L'activité du récepteur soluble sur les cellules murines B9 a tout d'abord été surprenante. En effet, outre son effet synergique sur l'action de l'IL-6, le sIL-6R possède une action agoniste propre qui induit la prolifération des cellules B9. Grâce aux anticorps anti-IL-6 générés dans le laboratoire, nous avons pu mettre en évidence que cet effet était totalement IL-6 dépendant. L'addition de sIL-6R en quantité suffisante dans le milieu de culture des cellules pouvait induire une boucle autocrine grâce à l'IL-6 très probablement synthétisée de manière résiduelle par les cellules B9 elles mêmes.

Sur des cellules d'hépatomes de rat (H35) ou des cultures primaires d'hépatocytes de rat nous n'avons pas noté d'effet spécifique du rsIL-6R seul ou associé à de l'IL-6 sur la synthèse des protéines de la phase aiguë. Nous avons donc conclu que le nombre de récepteur présent à la surface des hépatocytes, ou le ratio des molécules de gp80 sur celui de

gp130 est sans doute optimum quant à la genèse d'un signal visant à augmenter la synthèse des protéines de la phase aiguë.

Bien que non rapporté dans nos travaux, dans une expérience préliminaire, l'injection de sIL-6R et d'IL-6 (exprimée dans *E. coli*) concomitamment chez le rat n'a pas induit de modification du niveau des protéines de la phase aiguë significativement différente de celle observée avec de l'IL-6 seule.

La production et la purification de protéine recombinante étant particulièrement fastidieuse nous ne pouvions envisager de faire des expériences chez l'animal au moyen de protéine purifiée. L'adénovirus s'est révélé dans notre laboratoire et dans de nombreux autres un système extrêmement efficace pour l'administration à l'animal de cytokines ou hormones. En règle général, l'administration d'un adénovirus recombinants induit une augmentation transitoire mais constante de la protéine dont le gène a été introduit. La possibilité de générer ce type de vecteur viral au sein du laboratoire a été l'occasion de tester ce mode d'administration d'un récepteur soluble à l'animal.

Puisque nous ne possédions pas de mode de caractérisation de la protéine, nous avons été obligé de travailler au niveau des acides nucléiques et c'est grâce à des profils de restriction et des sondes spécifiques que nous avons caractérisé d'une part les virus recombinants puis les clones produisant l'ARN messager spécifique du récepteur. C'est en travaillant sur des Northern blots pour la caractérisation de différents virus recombinants que nous nous sommes aperçus que les insertions en E3 donnait lieu à de multiples ARNm contrairement à ce qui se produisait lors des insertions en E1. L'explication résiderait dans le fait de multiples sites d'initiation en E3 et particulièrement de cadres de lecture initiés au niveau du promoteur MLP en amont de l'insert. Ce phénomène n'existe pas pour les insertions en E1, ou tout du moins n'apparaît pas par analyse Northern blot. Par comparaison de l'intensité des bandes d'hybridation dans les cellules HepG2 et H35, nous avons observé que la quantité relative d'ARNm était moindre dans H35 que dans HepG2. Nous verrons par la suite que cette différence se révèle aussi au niveau protéique.

La caractérisation complète du virus recombinant au niveau nucléique nous a permis de l'injecter au lapin en vue de produire des anticorps spécifique. Ce mode d'administration avait déjà fait ses preuves avec un adénovirus recombinant exprimant l'IL-6. La possibilité de faire des rappels à l'animal avec la protéine exprimée dans baculovirus était indispensable. En effet, on sait qu'une seule administration d'adénovirus, même déficient pour la réplication, induit une forte immunité contre les protéines virales et proscrit toute réinjection ultérieure du vecteur viral recombinant. En testant les sérums des lapins à différents temps après l'immunisation, soit par Western blot des surnageant de cellules infectées par Ad5.rsIL-6R, de la protéine générée par baculovirus ou *E. coli*, soit en mesurant l'effet des anticorps sur des cellules B9, nous avons sélectionné deux pools de séra très spécifiques de la protéine recombinante. La purification des immunoglobulines à partir des ces sérums, nous a fourni un réactif très précieux d'une part pour les Western blots et d'autre part pour la mise au point d'un ELISA.

Une méthode de dosage de la protéine recombinante ou naturelle était indispensable pour apprécier le potentiel de notre stratégie adénovirale. Nous avons mis au point plusieurs méthodes ELISA, une seule, la technique directe dont la description fait partie de la deuxième publication s'est révélée être fiable. La première technique consistait à coater des plaques avec de l'IL-6 recombinante (*E. coli*) puis de faire réagir des concentrations croissantes de récepteur soluble; la détection du sIL-6R lié était mesurée grâce aux anticorps spécifiques. Nous n'avons jamais pu optimiser cette méthode et la mesure d'absorbance finale était toujours trop faible. La seconde technique consistait à recouvrir les puits d'un premier anticorps polyclonal provenant d'un pool, de faire réagir des concentrations connues de récepteur soluble puis de détecter la fraction liée grâce à un anticorps purifié du second pool. Cette technique "sandwich" reconnue comme beaucoup plus spécifique n'a pas été applicable aux échantillons biologiques que nous avons testés du fait, sans doute, de réactions non spécifiques. La linéarité de la courbe standard effectuée dans des milieux biologiques n'était pas respectée. Ainsi, après avoir testé toutes ces méthodes, nous nous sommes reportés sur une technique simple mais qui a prouvé être fiable sans nous procurer une sensibilité exceptionnelle (10 à 50 ng/ml). Nous avons donc choisi ce compromis.

Comme dans le cas de la protéine synthétisée dans les cellules d'insectes, il fallait valider l'activité du matériel recombinant produit par notre construction adénovirale. Le système hétérologue sur les cellules HepG2 nous a ainsi permis de vérifier l'activité biologique du sIL-6R exprimé par Ad5.E1.rsIL-6R. Une information de grande importance s'est dégagée de ces expériences. Des cellules infectées par les adénovirus déficient pour la réplication conservaient toutes leur potentialité, au moins en terme de synthèse protéique. Des expériences non rapportées ont consistées à co-infecter des cellules HepG2 par un adénovirus exprimant de l'IL-6 murine et celui exprimant le récepteur soluble et d'observer l'effet sur la production d'alpha-1 anti chymotrypsine. Comme ce que nous avons rapporté précédemment avec les protéines recombinantes, la co-infection et par conséquent la production des deux protéines induit la production des protéines de la phase aiguë. Cette notion de conservation de l'activité cellulaire, après l'infection adénovirale, est importante dans la mise au point d'essais biologiques.

Les expériences d'infection de différents types cellulaires ont permis de dégager de nombreux points. D'une part, et cela avait déjà été observé avec d'autres adénovirus recombinants exprimant d'autres cytokines, les vecteurs adénoviraux permettent la synthèse d'une quantité appréciable de protéines recombinantes et n'ont rien à envier aux autres systèmes d'expression. La quantité de 15 µg/24h/10⁵ fibroblastes pulmonaires humains indique clairement le potentiel du système. D'autre part ces expériences indiquent clairement l'influence, entre autres, du promoteur. Peu d'équipes se sont intéressées à l'influence du promoteur selon l'espèce et le type cellulaire. De nombreuses études dans notre laboratoires ont clairement montré que des promoteurs même relativement identiques pouvaient se comporter très différemment dans des types cellulaires différents ou dans des espèces différentes. La production 10 fois moindre de rsIL-6R dans les cellules H35 comparées aux fibroblastes humains démontre l'ampleur du problème. Ainsi nous pouvons tirer la conclusion que les études *in vitro* en vue d'expériences *in vivo* doivent être conduites très minutieusement en considérant le type cellulaire majoritairement visée. Je fais bien entendu abstraction des cellules peu ou pas infectables...

Les injections *in vivo* ont confirmé l'excellent vecteur qu'était l'adénovirus, d'une part lorsque nous avons généré les anticorps chez le lapin puis lors des injections chez le rat. Chez ce dernier, la synthèse protéique, détectée par nos méthodes peu sensibles (Western blot et ELISA), a montré une production d'une quinzaine de jours, période qui constitue la moyenne de ce qui a été rapporté par notre laboratoire avec des vecteurs similaires et différentes cytokines. L'injection intra-trachéale induit, comme de nombreux auteurs l'ont rapporté, une inflammation transitoire mais qui est proportionnelle à la quantité de virus injectée. Dans chacune de nos expériences, nous nous sommes efforcés de réduire la quantité de virus introduite dans les poumons et nous nous sommes basés sur l'expérience exceptionnelle du laboratoire dans ce domaine. Si, lorsque nous utilisons 1.10^9 p.f.u. par animal, il y a une inflammation modérée visible lors de l'étude anatomo-pathologique, la décroissance à des doses inférieures ou égales à 5.10^8 p.f.u. n'induit que peu ou pas d'inflammation selon le lot de virus. Les procédés de purification virale ont été améliorée au cours de mon travail (gel filtration) et la qualité des lots utilisés est très reproductible et répond aux exigences les plus sévères (RAC). En limitant les variations dues à la purification, l'effet propre de la cytokine étudiée est beaucoup plus discernable du bruit de fond. Ainsi avons nous la certitude que le sIL-6R n'a pas d'effet propre au niveau pulmonaire par les techniques d'études employées. Par contre, la co-administration d'IL-6 et de sIL-6R au moyen d'adénovirus a clairement indiqué un effet spécifique de cette combinaison par rapport à l'IL-6 seule. L'apparition de signes de fibrose semble indiquer le recrutement de cellules normalement non affectées par l'IL-6. Les propriétés agonistes du rsIL-6R expliquent sans doute ce phénomène.

Au niveau systémique et en particulier après injection intra-péritonéale, les résultats sont décevants sur la réponse de la phase aiguë. Il est évident que cela ne constitue qu'une infime partie des systèmes biologiques pouvant être affectés par une modification des taux circulants de rsIL-6R.

Nous aurions pu penser que le sens de notre réflexion allait suivre nos expérimentations c'est à dire aller du gène à l'animal mais c'était sans compter sur la découverte d'un effet inattendu des anticorps spécifiques dirigés contre le récepteur à l'IL-6. Il nous a donc fallu replonger au niveau cellulaire et analyser dans la cellule les effets

paradoxaux de ces anticorps. Nos moyens étant limités, nous ne pourrons fournir une explication suffisamment étayée indiquant les raisons de l'activation des protéines STAT dans la cellule B9 et son inhibition par les mêmes anticorps dans les autres cellules.

11. PERSPECTIVES

Afin de compléter les résultats de l'équipe de Rose-John décrivant une régulation du clivage protéolytique du récepteur membranaire par les esters de phorbol, nous avons tenté à maintes reprises de provoquer un relargage de sIL-6R par du PMA. Malheureusement, peut-être à cause de notre méthode de dosage ou du choix des cellules, nous n'avons jamais pu mettre en évidence la moindre trace de récepteur soluble dans le milieu de culture. Sans doute faut-il préciser que nous avons travaillé sur de très nombreuses variétés de cellules: des cellules d'hépatomes (HepG2, H35), une lignée de mastocytes, des cultures primaires d'hépatocytes et des hybridomes (B9).

Un des éléments qui nous est apparu comme intéressant durant notre travail, est la présence de nombreuses bandes de masses moléculaires inférieures à 55 kDa sur les Western blots réalisés à partir de surnageants de culture de cellules HepG2. En effet, à la lumière de ce qu'a décrit Rose-John et son équipe quant au clivage du récepteur membranaire, il serait important de regarder si des fragments de petite taille ne peuvent pas se lier à l'IL-6 et exercer une action inhibitrice. On pourrait envisager le relargage de protéines ayant conservé leur capacité à lier l'IL-6 et ne pouvant interagir avec la gp130; ces protéines seraient alors de véritables antagonistes de l'IL-6 car elles entreraient en compétition avec le récepteur membranaire sans possibilité de transmettre un quelconque signal.

La synergie entre l'IL-6 et son récepteur soluble pour bloquer la prolifération des mélanocytes a été testée de nombreuses fois, en particulier à l'aide de l'adénovirus exprimant le sIL-6R. L'effet, s'il existe, nous apparut comme très minime et certainement loin de ce qui a été décrit par Mackiewicz (Mackiewicz et al., 1995). On peut dans ce cas incriminer la virulence de la lignée cellulaire utilisée et sa trop forte propension à proliférer. Une étude plus approfondie sur d'autres lignées mélanocytaires serait appropriée.

Les travaux de Kishimoto et de ses collaborateurs ayant trait à l'action de l'IL-6 et du récepteur soluble sur les ostéoblastes me semblent aussi particulièrement intéressant. L'implication de ce système dans une maladie telle que l'ostéoporose me paraît être fondamentale à étudier.

Bien évidemment, de nombreuses études seraient réalisables sur le modèle animal développé et au moyen des réactifs disponibles. Que ce soit sur des modèles de fibrose

pulmonaire, d'ostéoporose ou de processus tumoraux l'implication du récepteur soluble parait être importante à étudier.

12. BIBLIOGRAPHIE

Aderka, D., Maor, Y., Novick, D., Engelmann, H., Kahn, Y., Levo, Y., Wallach, D., and Revel, M. (1993). Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-alpha or -beta. *Blood* 81, 2076-84.

Akira, S., and Kishimoto, T. (1992). Mechanisms of soluble mediators. *Current Opinion in Immunology* 4, 307-13.

Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. [Review]. *Advances in Immunology* 54, 1-78.

Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Tran-Thi, T. A., Decker, K., and Heinrich, P. C. (1988). Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures. *Eur J Biochem* 173, 287-93.

Andus, T., Geiger, T., Klapproth, J., Kunz, D., Heisig, M., Castell, J., and Heinrich, P. C. (1988). Regulation of alpha 2-macroglobulin gene expression by interleukin-6 (BSF-2/HSF). *Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine* 13, 265-76.

Atsumi, T., Kato, K., Kurosawa, S., Abe, M., and Fujisaku, A. (1995). A case of Crow-Fukase syndrome with elevated soluble interleukin-6 receptor in cerebrospinal fluid. Response to double-filtration plasmapheresis and corticosteroids. *Acta Haematol* 94, 90-94.

Barton, B. E., Jackson, J. V., Lee, F., and Wagner, J. (1994). Oncostatin M stimulates proliferation in B9 hybridoma cells: potential role of oncostatin M in plasmacytoma development. *Cytokine* 6, 147-53.

Bauer, J. (1989). Interleukin-6 and its receptor during homeostasis, inflammation, and tumor growth. [Review]. *Klinische Wochenschrift* 67, 697-706.

Baumann, H., and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. [Review]. *Immunology Today* 15, 74-80.

Baumann, H., and Gauldie, J. (1990). Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. [Review]. *Molecular Biology & Medicine* 7, 147-59.

Baumann, H., Gearing, D., and Ziegler, S. F. (1994). Signaling by the cytoplasmic domain of hematopoietin receptors involves two distinguishable mechanisms in hepatic cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 16297-304.

Baumann, H., and Schendel, P. (1991). Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. *Journal of Biological Chemistry* 266, 20424-7.

Baumann, H., Symes, A. J., Comeau, M. R., Morella, K. K., Wang, Y., Friend, D., Ziegler, S. F., Fink, J. S., and Gearing, D. P. (1994). Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells. *Molecular & Cellular Biology* 14, 138-46.

Baumann, M., Baumann, H., and Fey, G. H. (1990). Molecular cloning, characterization and functional expression of the rat liver interleukin 6 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 265, 19853-62.

Bazan, J. F. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. [Review]. *Immunology Today* 11, 350-4.

Bazan, J. F. (1991). Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 7, 197-208.

Begley, C. G. (1994). The SCL transcription factor and differential regulation of macrophage differentiation by LIF, OSM and IL-6. *Stem Cells* 12, 143-151.

Bett, A. J., Haddara, W., Prevec, L., and Graham, F. L. (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8802-8806.

Bett, A. J., Prevec, L., and Graham, F. L. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *Journal of Virology* 67, 5911-21.

Brakenhoff, J. P., de Hon, F. D., Fontaine, V., ten Boekel, E., Schooltink, H., Rose-John, S., Heinrich, P. C., Content, J., and Aarden, L. A. (1994). Development of a human interleukin-6 receptor antagonist. *Journal of Biological Chemistry* 269, 86-93.

Brandt, J. S., Bodine, D. M., Dunbar, C. E., and Nienhuis, A. (1990). Dysregulated Interleukin-6 Expression Produces a Syndrome Resembling Castleman's Disease in Mice. *The Journal of Clinical Investigation* 86, 592-599.

Budel, L. M., Dong, F., Lowenberg, B., and Touw, I. P. (1995). Hematopoietic growth factor receptors: Structure variations and alternatives of receptor complex formation in normal hematopoiesis and in hematopoietic disorders. *Leukemia* 9, 553-561.

Burger, R., and Gramatzki, M. (1993). Responsiveness of the interleukin (IL)-6-dependent cell line B9 to IL-11 [letter]. *Journal of Immunological Methods* 158, 147-8.

Castell, J. V., Andus, T., Kunz, D., and Heinrich, P. C. (1989). Interleukin-6. The major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 557, 87-99; discussion 100-1.

Chua, A. O., Chizzonite, R., Desai, B. B., Truitt, T. P., Nunes, P., Minetti, L. J., Warriar, R. R., Presky, D. H., Levine, J. F., Gately, M. K., and et al. (1994). Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *Journal of Immunology* 153, 128-36.

Coulie, P. G., Stevens, M., and Van Snick, J. (1989). High- and low-affinity receptors for murine interleukin 6. Distinct distribution on B and T cells. *European Journal of Immunology* 19, 2107-14.

Davis, S., Aldrich, T. H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N. Y., and Yancopoulos, G. D. (1993). LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260, 1805-8.

De Benedetti, F., Massa, M., Pignatti, P., Albani, S., Novick, D., and Martini, A. (1994). Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 93, 2114-9.

de Hon, F. D., Ehlers, M., Rose-John, S., Ebeling, S. B., Bos, H. K., Aarden, L. A., and Brakenhoff, J. P. (1994). Development of an interleukin (IL) 6 receptor antagonist that inhibits IL-6-dependent growth of human myeloma cells. *Journal of Experimental Medicine* 180, 2395-400.

De Serio, A., Graziani, R., Laufer, R., Ciliberto, G., and Paonessa, G. (1995). In vitro binding of ciliary neurotrophic factor to its receptors: evidence for the formation of an IL-6-type hexameric complex. *J Mol Biol* 254, 795-800.

Dehon, F. D., Tenboekel, E., Herrman, J., Clement, C., Ehlers, M., Taga, T., Yasukawa, K., Ohsugi, Y., Kishimoto, T., Rosejohn, S., Wijdenes, J., Kastelein, R., Aarden, L. A., and Brakenhoff, J. P. J. (1995). Functional distinction of two regions of human interleukin 6 important for signal transduction via GP130. *Cytokine* 7, 398-407.

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. *Journal of Immunological Methods* 173, 229-35.

Ehlers, M., de Hon, F. D., Bos, H. K., Horsten, U., Kurapkat, G., van De Leur, H. S., Grotzinger, J., Wollmer, A., Brakenhoff, J. P., and Rose-John, S. (1995). Combining two mutations of human interleukin-6 that affect gp130 activation results in a potent interleukin-6 receptor antagonist on human myeloma cells. *Journal of Biological Chemistry* 270, 8158-63.

Ehlers, M., Grotzinger, J., deHon, F. D., Mullberg, J., Brakenhoff, J. P., Liu, J., Wollmer, A., and Rose-John, S. (1994). Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction. *Journal of Immunology* 153, 1744-53.

Evans, M., and Abdou, N. I. (1994). Anti-interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 3, 161-6.

Feldman, G. M., Petricoin, E. F. r., David, M., Larner, A. C., and Finbloom, D. S. (1994). Cytokines that associate with the signal transducer gp130 activate the interferon-induced transcription factor p91 by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 269, 10747-52.

Fiorillo, M. T., Toniatti, C., Van Snick, J., and Ciliberto, G. (1992). Expression of the murine interleukin 6 receptor in hepatoma cells: the intracytoplasmic domain is not required for interleukin 6 signal transduction. *European Journal of Immunology* 22, 799-804.

Fontaine, V., Brakenhoff, J., De Wit, L., Arcone, R., Ciliberto, G., and Content, J. (1991). Internal deletions in human interleukin-6: structure-function analysis. *Gene* 104, 227-34.

Fontaine, V., Savino, R., Arcone, R., de Wit, L., Brakenhoff, J. P., Content, J., and Ciliberto, G. (1993). Involvement of the Arg179 in the active site of human IL-6. *European Journal of Biochemistry* 211, 749-55.

Frieling, J. T., Sauerwein, R. W., Wijdenes, J., Hendriks, T., and van der Linden, C. J. (1994). Soluble interleukin 6 receptor in biological fluids from human origin. *Cytokine* 6, 376-81.

Frieling, J. T., van Deuren, M., Wijdenes, J., van der Meer, J. W., Clement, C., van der Linden, C. J., and Sauerwein, R. W. (1995). Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 171, 469-72.

Gabay, C., Silacci, P., Genin, B., Mentha, G., Le Coultre, C., and Guerne, P. A. (1995). Soluble interleukin-6 receptor strongly increases the production of acute-phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes. *Eur J Immunol* 25, 2378-2383.

Gadient, R. A., and Otten, U. (1993). Differential expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroscience Letters* 153, 13-16.

Gadient, R. A., and Otten, U. (1994). Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Research* 637, 10-4.

Gaillard, J. P., Bataille, R., Brailly, H., Zuber, C., Yasukawa, K., Attal, M., Maruo, N., Taga, T., Kishimoto, T., and Klein, B. (1993). Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *European Journal of Immunology* 23, 820-4.

Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., and Baumann, H. (1987). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7251-5.

Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., and et al. (1992). The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255, 1434-7.

Geisterfer, M., Richards, C., Baumann, M., Fey, G., Gywnne, D., and Gauldie, J. (1993). Regulation of IL-6 and the hepatic IL-6 receptor in acute inflammation in vivo. *Cytokine* 5, 1-7.

Geisterfer, M., Richards, C. D., and Gauldie, J. (1995). Cytokines oncostatin M and interleukin 1 regulate the expression of the IL-6 receptor (gp80, gp130). *Cytokine* 7, 503-509.

Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneidermergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1996). Differential activation of acute phase response factor/ STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130 .1. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* 271, 12991-12998.

Ginsberg, H. S. (1984). *The Adenoviruses* (New York: Plenum Publishing Corp.).

Goldman, M. J., and Wilson, J. M. (1995). Expression of alpha(nu)beta(5) integrin is necessary for efficient adenovirus-mediated gene transfer in the human airway. *J Virol* 69, 5951-5958.

Graham, F. L., and Prevec, L. (1991). Manipulation of Adenovirus Vectors. In *Methods in Molecular Biology*, E. J. Murray, ed. (Clifton, NJ: The Humana Press Inc.), pp. 109-128.

Gu, Z. J., Wijdenes, J., Zhang, X. G., Hallet, M. M., Clement, C., and Klein, B. (1996). Anti-gp130 transducer monoclonal antibodies specifically inhibiting ciliary neurotrophic factor, interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor or oncostatin M. *J Immunol Methods* 190, 21-27.

Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R., and et al. (1995). A major role for the protein

tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *Embo J* 14, 1421-1429.

Hammacher, A., Simpson, R. J., and Nice, E. C. (1996). The interleukin-6 (IL-6) partial antagonist (Q159E,T162P)IL-6 interacts with the IL-6 receptor and gp130 but fails to induce a stable hexameric receptor complex. *J Biol Chem* 271, 5464-5473.

Heinrich, P. C., Graeve, L., Rose-John, S., Schneider-Mergener, J., Dittrich, E., Erren, A., Gerhartz, C., Hemann, U., Luttkien, C., Wegenka, U., and et al. (1995). Membrane-bound and soluble interleukin-6 receptor: studies on structure, regulation of expression, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 762, 222-236;.

Heldin, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. [Review]. *Cell* 80, 213-23.

Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63, 1149-57.

Hilton, D. J., Hilton, A. A., Raicevic, A., Rakar, S., Harrison-Smith, M., Gough, N. M., Begley, C. G., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Willson, T. A. (1994). Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO Journal* 13, 4765-75.

Hilton, D. J., Watowich, S. S., Katz, L., and Lodish, H. F. (1996). Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 271, 4699-4708.

Hirano, T. (1992). Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clinical Immunology & Immunopathology* 62, S60-5.

Hirano, T., Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990). Biological and clinical aspects of interleukin 6 [see comments]. *Immunol Today* 11, 443-9.

Hirano, T., Taga, T., Yamasaki, K., Matsuda, T., Yasukawa, K., Hirata, Y., Yawata, H., Tanabe, O., Akira, S., and Kishimoto, T. (1989). Molecular cloning of the cDNAs for interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 and its receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 557, 167-78, discussion 178-80.

Hirata, Y., Taga, T., Hibi, M., Nakano, N., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Immunology* 143, 2900-6.

Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T., and Taga, T. (1995). Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4862-6.

Hitt, M., Bett, A. J., Addison, C. L., Prevec, L., and Graham, F. L. (1995). Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. In *Viral Gene Techniques*, K. W. Adolph, ed. (525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495: Academic Press Inc), pp. 13-30.

Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T., and Kishimoto, T. (1992). Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *Journal of Immunology* 148, 2175-80.

Hooper, W. C., Phillips, D. J., Ribeiro, M., Benson, J., and Evatt, B. L. (1995). IL-6 upregulates protein S expression in the HepG-2 hepatoma cells. *Thromb Haemost* 73, 819-824.

Horiuchi, S., Koyanagi, Y., Zhou, Y., Miyamoto, H., Tanaka, Y., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M., and Yamamoto, N. (1994). Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are

generated through an alternative splicing mechanism. *European Journal of Immunology* 24, 1945-8.

Horseman, N. D., and Yu-Lee, L. Y. (1994). Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. [Review]. *Endocrine Reviews* 15, 627-49.

Horwitz, M. S. (1990). Adenoviridae and their replication. In *Virology*, B.N. Fields and D. M. K. e. al., eds. (New York: Raven Press, Ltd.), pp. 1679-1721.

Huang, S., Endo, R. I., and Nemerow, G. R. (1995). Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *Journal of Virology* 69, 2257-63.

Iglesias, M., Plowman, G. D., and Woodworth, C. D. (1995). Interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor regulate proliferation of normal, human papillomavirus-immortalized, and carcinoma-derived cervical cells in vitro. *Am J Pathol* 146, 944-952.

Ishikawa, M., Saito, Y., Miyamoto, Y., Kuwahara, K., Ogawa, E., Nakagawa, O., Harada, M., Masuda, I., and Nakao, K. (1996). cDNA cloning of rat cardiotrophin-1 (CT-1): Augmented expression of CT-1 gene in ventricle of genetically hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 377-381.

Jones, T. H. (1994). Interleukin-6 an endocrine cytokine. *Clinical Endocrinology* 40, 703-713.

Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. [Review]. *Blood* 74, 1-10.

Kishimoto, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor in autoimmunity. [Review]. *Journal of Autoimmunity* 5 Suppl A, 123-32.

- Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. [Review]. *Science* 258, 593-7.
- Kishimoto, T., Taga, T., and Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. [Review]. *Cell* 76, 253-62.
- Klein, B. (1995). Cytokine, Cytokine Receptors, Transduction Signals, and Oncogenes in Human Multiple Myeloma. *Seminars in Hematology* 32, 4-19.
- Klein, B., Zhang, X. G., Lu, Z. Y., and Bataille, R. (1995). Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 85, 863-872.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-42.
- Kopf, M., Legros, G., Coyle, A. J., Koscovilbois, M., and Brombacher, F. (1995). Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol Rev* 148, 45-69.
- Korholz, D., Nussbaum, P., Pafferath, B., Mauz-Korholz, C., Hempel, L., and Burdach, S. (1994). Activation of protein kinase C induces de novo synthesis of the soluble interleukin-6 receptor in human B cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 40, 515-20.
- Kozarsky, K. F., and Wilson, J. M. (1993). Gene therapy: adenovirus vectors. *Current Opinion In Genetics and Development* 3, 499-503.
- Kyrtsonis, M. C., Dedoussis, G., Zervas, C., Perifanis, V., Baxevas, C., Stamatelou, M., and Maniatis, A. (1996). Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R), a new prognostic factor in multiple myeloma. *Br J Haematol* 93, 398-400.

Lavabre-Bertrand, T., Exbrayat, C., Liautard, J., Gaillard, J. P., Baskevitch, P. P., Poujol, N., Duperray, C., Bourquard, P., and Brochier, J. (1995). Detection of membrane and soluble interleukin-6 receptor in lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 91, 871-877.

Le, J., and Vilcek, J. (1989). Interleukin-6: A Multifunctional Cytokine Regulating Immune Reactions and the Acute Phase Protein Response. *Laboratory Investigation* 61, 588-602.

Leebeek, F. W., and Fowlkes, D. M. (1992). Construction and functional analysis of hybrid interleukin-6 variants. Characterization of the role of the C-terminus for species specificity. *FEBS Letters* 306, 262-4.

Leebeek, F. W., Kariya, K., Schwabe, M., and Fowlkes, D. M. (1992). Identification of a receptor binding site in the carboxyl terminus of human interleukin-6. *Journal of Biological Chemistry* 267, 14832-8.

Lehrnbecher, T., Schrod, L., Kraus, D., Roos, T., Martius, J., and Vonstockhausen, H. B. (1995). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in cord blood in the diagnosis of early onset sepsis in neonates. *Acta Paediat* 84, 806-808.

Lust, J. A., Donovan, K. A., Kline, M. P., Greipp, P. R., Kyle, R. A., and Maihle, N. J. (1992). Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 4, 96-100.

Lust, J. A., Jelinek, D. F., Donovan, K. A., Frederick, L. A., Huntley, B. K., Braaten, J. K., and Maihle, N. J. (1995). Sequence, expression and function of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor (sIL-6R). *Curr Top Microbiol Immunol* 194, 199-206.

Lutticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., and et al. (1994). Association of

transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263, 89-92.

Mackiewicz, A., Rose-John, S., Schooltink, H., Laciak, M., Gorny, A., and Heinrich, P. C. (1992). Soluble human interleukin-6-receptor modulates interleukin-6-dependent N-glycosylation of alpha 1-protease inhibitor secreted by HepG2 cells. *FEBS Letters* 306, 257-61.

Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1992). Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *Journal of Immunology* 149, 2021-7.

Mackiewicz, A., Wiznerowicz, M., Roeb, E., Karczewska, A., Nowak, J., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1995). Soluble interleukin 6 receptor is biologically active in vivo. *Cytokine* 7, 142-9.

Maeda, T., Yamaguchi, M., Taga, T., Kishimoto, T., Wada, K., Ikegami, H., Kurachi, H., and Miyake, A. (1994). Decidua is a possible source of serum mouse soluble interleukin-6 receptor (msIL-6R): gestational profile of serum msIL-6R concentration. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 205, 998-1003.

Maes, M., Meltzer, H. Y., Bosmans, E., Bergmans, R., Vandoolaeghe, E., Ranjan, R., and Desnyder, R. (1995). Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J Affective Disord* 34, 301-309.

Matsuda, T., and Hirano, T. (1994). Association of p72 tyrosine kinase with Stat factors and its activation by interleukin-3, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 83, 3457-61.

Matsuda, T., and Hirano, T. (1994). Establishment of the ELISA for murine soluble gp130, a signal transducer for the IL-6 family cytokine, and its detection in the ascitic fluids of tumor-bearing mice. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 202, 637-42.

Matsuda, T., Hirano, T., Nagasawa, S., and Kishimoto, T. (1989). Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *Journal of Immunology* 142, 148-52.

Matsuda, T., Yamanaka, Y., and Hirano, T. (1994). Interleukin-6-induced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in murine hematopoietic lineage cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 200, 821-8.

Matsuzaki, N., Neki, R., Sawai, K., Shimoya, K., Okada, T., Sakata, M., Saji, F., Koishihara, Y., and Ida, N. (1995). Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor in the sera of pregnant women forms a complex with IL-6 and augments human chorionic gonadotropin production by normal human trophoblasts through binding to the IL-6 signal transducer. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2912-2917.

May, L. T., Ndubuisi, M. I., Patel, K., and Garcia, D. (1995). Interleukin-6 chaperones in blood. *Ann N Y Acad Sci* 762, 120-128.

May, L. T., Neta, R., Moldawer, L. L., Kenney, J. S., Patel, K., and Sehgal, P. B. (1993). Antibodies chaperone circulating IL-6. Paradoxical effects of anti-IL-6 "neutralizing" antibodies in vivo. *Journal of Immunology* 151, 3225-36.

May, L. T., Patel, K., Garcia, D., Ndubuisi, M. I., Ferrone, S., Mittelman, A., Mackiewicz, A., and Sehgal, P. B. (1994). Sustained high levels of circulating chaperoned interleukin-6 after active specific cancer immunotherapy. *Blood* 84, 1887-95.

May, L. T., Viguet, H., Kenney, J. S., Ida, N., Allison, A. C., and Sehgal, P. B. (1992). High levels of "complexed" interleukin-6 in human blood. *Journal of Biological Chemistry* 267, 19698-704.

Mihara, M., Moriya, Y., Kishimoto, T., and Ohsugi, Y. (1995). Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. *Br J Rheumatol* 34, 321-325.

Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., Ishida, O., Ikeda, H., Tsuruta, O., Harada, K., Tateishi, H., Nishiyama, T., and Tanikawa, K. (1995). Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* 36, 45-9.

Miyajima, A., Hara, T., and Kitamura, T. (1992). Common subunits of cytokine receptors and the functional redundancy of cytokines. [Review]. *Trends in Biochemical Sciences* 17, 378-82.

Montero-Julian, F. A., Klein, B., Gautherot, E., and Brailly, H. (1995). Pharmacokinetic study of anti-interleukin-6 (IL-6) therapy with monoclonal antibodies: Enhancement of IL-6 clearance by cocktails of anti-IL-6 antibodies. *Blood* 85, 917-924.

Mullberg, J., Dittrich, E., Graeve, L., Gerhartz, C., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993). Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Letters* 332, 174-8.

Mullberg, J., Durie, F. H., Ottenevans, C., Alderson, M. R., Rosejohn, S., Cosman, D., Black, R. A., and Mohler, K. M. (1995). A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J Immunol* 155, 5198-5205.

Mullberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1994). The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *Journal of Immunology* 152, 4958-68.

Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993). The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European Journal of Immunology* 23, 473-80.

Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1992). Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 189, 794-800.

Munck Petersen, C., Davidsen, O., Moestrup, S. K., Sonne, O., Nykjaer, A., and Moller, B. K. (1990). Cellular targets and receptors for interleukin-6. II. Characterization of IL-6 binding and receptors in peripheral blood cells and macrophages. *European Journal of Clinical Investigation* 20, 377-84.

Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, 1808-10.

Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1991). Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 11349-53.

Nakajima, T., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Hirano, T., Kishimoto, T., Tokunaga, T., and Honda, M. (1992). Soluble interleukin-6 receptor is released from receptor-bearing cell lines in vitro. *Japanese Journal of Cancer Research* 83, 373-8.

Narazaki, M., Witthuhn, B. A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J. N., Kishimoto, T., and Taga, T. (1994). Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 2285-9.

Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G. D., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 82, 1120-6.

Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (1994). Derivation of germline competent embryonic stem cells with a combination of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor. *Experimental Cell Research* 215, 237-9.

Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D., Leitner, O., Revel, M., and Rubinstein, M. (1990). Purification of soluble cytokine receptors from normal human urine by ligand-affinity and immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography* 510, 331-7.

Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D., and Rubinstein, M. (1989). Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *Journal of Experimental Medicine* 170, 1409-1414.

Novick, D., Shulman, L. M., Chen, L., and Revel, M. (1992). Enhancement of interleukin 6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibody. *Cytokine* 4, 6-11.

Oh, J. W., Revel, M., and Chebath, J. (1996). A soluble interleukin 6 receptor isolated from conditioned medium of human breast cancer cells is encoded by a differentially spliced mRNA. *Cytokine* 8, 401-409.

Ohtani, K., Ninomiya, H., Hasegawa, Y., Kobayashi, T., Kojima, H., Nagasawa, T., and Abe, T. (1995). Clinical significance of elevated soluble interleukin-6 receptor levels in the sera of patients with plasma cell dyscrasias. *Br J Haematol* 91, 116-120.

Paonessa, G., Graziani, R., De Serio, A., Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Salvati, A. L., Toniatti, C., and Ciliberto, G. (1995). Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *EMBO Journal* 14, 1942-51.

Pennica, D., Shaw, K. J., Swanson, T. A., Moore, M. W., Shelton, D. L., Zioncheck, K. A., Rosenthal, A., Taga, T., Paoni, N. F., and Wood, W. I. (1995). Cardiotrophin-1 - Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor gp130 signaling complex. *J Biol Chem* 270, 10915-10922.

Pennica, D., Swanson, T. A., Shaw, K. J., Kuang, W. J., Gray, C. L., Beatty, B. G., and Wood, W. I. (1996). Human cardiotrophin-1: Protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization. *Cytokine* 8, 183-189.

Peters, M., Jacobs, S., Ehlers, M., Vollmer, P., Mullberg, J., Wolf, E., Brem, G., Zumbuschfeld, K. H. M., and Rosejohn, S. (1996). 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* 183, 1399-1406.

Peters, M., Roeb, E., Pennica, D., Zumbuschfeld, K. H. M., and Rosejohn, S. (1995). A new hepatocyte stimulating factor: Cardiotrophin-1 (CT-1). *FEBS Lett* 372, 177-180.

Puri, R. K., and Leland, P. (1992). Systemic Administration of Recombinant Interleukin-6 in Mice Induces Proliferation of Lymphoid Cells *In Vivo*. *Lymphokine and Cytokine Research* 11, 133-139.

Richards, C., Gauldie, J., and Baumann, H. (1991). Cytokine control of acute phase protein expression. [Review]. *European Cytokine Network* 2, 89-98.

Richards, C. D., Braciak, T., Xing, Z., Graham, F., and Gauldie, J. (1995). Adenovirus vectors for cytokine gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 762, 282-292;.

Richards, C. D., Brown, T. J., Shoyab, M., Baumann, H., and Gauldie, J. (1992). Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *Journal of Immunology* 148, 1731-6.

Rier, S. E., Zarmakoupis, P. N., Hu, X., and Becker, J. L. (1995). Dysregulation of interleukin-6 responses in ectopic endometrial stromal cells: correlation with decreased soluble receptor levels in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 80, 1431-7.

Roitt, I. (1994). *Essential Immunology*, 8th Edition (Oxford: Blackwell Scientific Publications).

Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F., and Poli, V. (1996). Impaired neutrophil response and CD4(+) T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 183, 1345-1355.

Rose, T. M., Weiford, D. M., Gunderson, N. L., and Bruce, A. G. (1994). Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine* 6, 48-54.

Rose-John, S., Ehlers, M., Grotzinger, J., and Mullberg, J. (1995). The soluble interleukin-6 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 762, 207-20; discussion 220-1.

Rose-John, S., and Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal* 300, 281-290.

Rose-John, S., Schooltink, H., Lenz, D., Hipp, E., Dufhues, G., Schmitz, H., Schiel, X., Hirano, T., Kishimoto, T., and Heinrich, P. C. (1990). Studies on the structure and regulation of the human hepatic interleukin-6 receptor. *European Journal of Biochemistry* 190, 79-83.

Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1992). Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *Journal of Immunology* 148, 4066-71.

Saito, T., Yasukawa, K., Suzuki, H., Futatsugi, K., Fukunaga, T., Yokomizo, C., Koishihara, Y., Fukui, H., Ohsugi, Y., Yawata, H., and et al. (1991). Preparation of soluble murine IL-6 receptor and anti-murine IL-6 receptor antibodies. *Journal of Immunology* 147, 168-73.

Schobitz, B., Pezeshki, G., Pohl, T., Hemmann, U., Heinrich, P. C., Holsboer, F., and Reul, J. M. (1995). Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB Journal* 9, 659-64.

Schooltink, H., Stoyan, T., Roeb, E., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1992). Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. *FEBS Letters* 314, 280-4.

Sehgal, P. B. (1990). Interleukin-6: a regulator of plasma protein gene expression in hepatic and non-hepatic tissues. [Review]. *Molecular Biology & Medicine* 7, 117-30.

Shimamura, T., Taki, S., Honda, H., Yokota, M., Ito, S., and Takahara, Y. (1991). Analysis of interleukin 6 (IL-6)/IL-6 receptor system using monoclonal anti-IL-6 antibodies. *Molecular Immunology* 28, 1155-61.

Singh, A., Purohit, A., Wang, D. Y., Duncan, L. J., Ghilchik, M. W., and Reed, M. J. (1995). IL-6sR: Release from MCF-7 breast cancer cells and role in regulating peripheral oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 147, R9-R12.

Smith, S. R., and Morgan, L. (1996). Clinical significance of elevated soluble interleukin 6 receptor levels in patients with plasma cell disorders. *Br J Haematol* 92, 767-768.

Snyers, L., Renauld, J. C., Szpirers, C., and Content, J. (1995). Cloning and chromosomal localization of a pseudogene corresponding to a mRNA for a soluble IL-6 receptor. *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping* 5, 311-314.

Solito, E., and Russo-Marie, F. (1995). Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réaction inflammatoire. *Médecine Thérapeutique* 1, 820-827.

Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., and et al. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263, 92-5.

Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., and Yancopoulos, G. D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349-1353.

Stoyan, T., Michaelis, U., Schooltink, H., Van Dam, M., Rudolph, R., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993). Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in *Escherichia coli*, renaturation and purification. *European Journal of Biochemistry* 216, 239-45.

Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7547-51.

Sugita, T., Totsuka, T., Saito, M., Yamasaki, K., Taga, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1990). Functional murine interleukin 6 receptor with the intracisternal A particle gene product at its cytoplasmic domain. Its possible role in plasmacytomagenesis. *Journal of Experimental Medicine* 171, 2001-9.

Suzuki, H., Yasukawa, K., Saito, T., Narazaki, M., Hasegawa, A., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). Serum soluble interleukin-6 receptor in MRL/lpr mice is elevated with age and mediates the interleukin-6 signal. *European Journal of Immunology* 23, 1078-82.

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573-81.

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yawata, H., Natsuka, S., Yasukawa, K., Totsuka, T., Yamasaki, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 receptor and a unique mechanism of its signal transduction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54 Pt 2, 713-22.

Taga, T., and Kishimoto, T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. [Review]. *FASEB Journal* 6, 3387-96.

Taga, T., and Kishimoto, T. (1990). Immune and hematopoietic cell regulation: cytokines and their receptors. [Review]. *Current Opinion in Cell Biology* 2, 174-80.

Taga, T., and Kishimoto, T. (1995). Signaling mechanisms through cytokine receptors that share signal transducing receptor components. *Curr Opin Immunol* 7, 17-23.

Taga, T., Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Miki, D., Hamaguchi, M., Davis, S., Shoyab, M., Yancopoulos, G. D., and Kishimoto, T. (1992). Functional inhibition of hematopoietic and neurotrophic cytokines by blocking the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10998-1001.

Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T., and et al. (1993). Soluble interleukin-6 receptor

- triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 11924-8.
- Tanner, J. W., Chen, W., Young, R. L., Longmore, G. D., and Shaw, A. S. (1995). The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem* 270, 6523-6530.
- Taverne, J. (1993). Transgenic mice in the study of cytokine function. *International Journal of Experimental Pathology* 74, 525-546.
- Top, F. H., Buescher, E. L., Bancroft, W. H., and Russell, P. K. (1971). Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. II. Antibody response and protective effect against acute respiratory disease due to adenovirus type 7. *Journal of Infectious Diseases* 124, 155-160.
- van Dam, M., Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Brakenhoff, J. P., Graeve, L., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993). Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding. *Journal of Biological Chemistry* 268, 15285-90.
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. [Review]. *Annual Review of Immunology* 8, 253-78.
- Wang, Y., Nesbitt, J. E., Fuentes, N. L., and Fuller, G. M. (1992). Molecular cloning and characterization of the rat liver IL-6 signal transducing molecule, gp130. *Genomics* 14, 666-72.
- Ward, L. D., Howlett, G. J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R. L., and Simpson, R. J. (1994). High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *Journal of Biological Chemistry* 269, 23286-9.

Ward, L. D., Howlett, G. J., Hammacher, A., Weinstock, J., Yasukawa, K., Simpson, R. J., and Winzor, D. J. (1995). Use of a biosensor with surface plasmon resonance detection for the determination of binding constants: measurement of interleukin-6 binding to the soluble interleukin-6 receptor. *Biochemistry* 34, 2901-2907.

Wegenka, U. M., Luttkicken, C., Buschmann, J., Yuan, J., Lottspeich, F., Muller-Esterl, W., Schindler, C., Roeb, E., Heinrich, P. C., and Horn, F. (1994). The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family. *Molecular & Cellular Biology* 14, 3186-96.

Weiergraber, O., Hemmann, U., Kuster, A., Muller-Newen, G., Schneider, J., Rose-John, S., Kurschat, P., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H., Stabel, S., and et al. (1995). Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization. *Eur J Biochem* 234, 661-669.

Wijdenes, J., Clement, C., Klein, B., Morel-Fourrier, B., Vita, N., Ferrara, P., and Peters, A. (1991). Human recombinant dimeric IL-6 binds to its receptor as detected by anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Molecular Immunology* 28, 1183-92.

Wijdenes, J., Heinrich, P. C., Mullernewen, G., Roche, C., Gu, Z. J., Clement, C., and Klein, B. (1995). Interleukin-6 signal transducer gp130 has specific binding sites for different cytokines as determined by antagonistic and agonistic anti-gp130 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 25, 3474-3481.

Witthuhn, B., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O., and Ihle, J. N. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following EPO stimulation. *Cell* 74, 227-236.

- Wolvekamp, M. C., and Marquet, R. L. (1990). Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett* 24, 1-9.
- Wong, G. W., and Clark, S. V. (1988). Multiple action of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunology Today* 9, 137-139.
- Xing, Z., Richards, C. D., Braciak, T., Thibault, V., and Gauldie, J. (1995). Cytokine regulation of hepatic acute phase protein expression. In *Cytokines and the liver*, Falk symposium 78, W. Gerok, K. Decker, T. Andus and V. Gross, eds. (Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic), pp. 164-171.
- Yamaguchi, M., Mammoto, A., Taga, T., Kishimoto, T., and Miyake, A. (1995). Regulation of mouse soluble interleukin-6 receptor secretion by decidua. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 1077-1082.
- Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241, 825-8.
- Yasukawa, K., Futatsugi, K., Saito, T., Yawata, H., Narazaki, M., Suzuki, H., Taga, T., and Kishimoto, T. (1992). Association of recombinant soluble IL-6-signal transducer, gp130, with a complex of IL 6 and soluble IL-6 receptor, and establishment of an ELISA for soluble gp130. *Immunology Letters* 31, 123-30.
- Yasukawa, K., Saito, T., Fukunaga, T., Sekimori, Y., Koishihara, Y., Fukui, H., Ohsugi, Y., Matsuda, T., Yawata, H., Hirano, T., and et al. (1990). Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. *Journal of Biochemistry* 108, 673-6.
- Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of

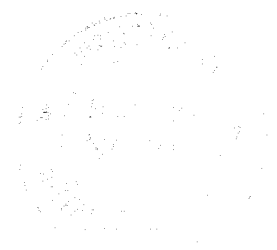
amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO Journal* 12, 1705-12.

Yokoyama, A., Kohno, N., Hirasawa, Y., Kondo, K., Abe, M., Inoue, Y., Fujioka, S., Fujino, S., Ishida, S., and Hiwada, K. (1995). Evaluation of soluble IL-6 receptor concentration in serum and epithelial lining fluid from patients with interstitial lung diseases. *Clinical & Experimental Immunology* 100, 325-9.

Zeni, F., Tardy, B., Vindimian, M., Pain, P., Gery, P., and Bertrand, J. C. (1995). Soluble Interleukin-6 Receptor in Patients with Severe Sepsis. *Journal of Infectious Diseases* 172, 607.

Zhang, X. G., Gu, J. J., Lu, Z. Y., Yasukawa, K., Yancopoulos, G. D., Turner, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., Bataille, R., and et al. (1994). Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1337-42.

Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95-8.



Nom, Prénom : THIBAUT Vincent

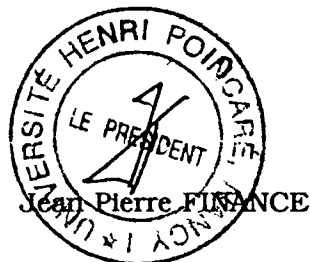
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 17 OCT 1996 UHP 74

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



Summary

Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine with immunological, hematological as well as inflammatory activities. Its effects are mediated through its interaction with a specific membrane bound receptor, the α chain or gp80, and a transducer β chain or gp130. A soluble form of gp80, gp54, is found in different physiological fluids at variable concentrations. Contrary to what has been described for other cytokine soluble receptors, that are generally considered as antagonists, soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) possesses agonistic activities. We have developed an animal model in the rat to study the *in vivo* effects of this protein. Using a molecular approach, we have expressed both in *E. coli* and in a baculovirus expression system the extra cellular domain of gp80. Recombinant proteins show similar biological activities and we confirmed, *in vitro*, that sIL-6R is a potent IL-6 agonist. sIL-6R confers responsiveness to hIL-6 to human hepatoma cells and induces murine hybridoma cells proliferation. We have generated a replication deficient recombinant adenovirus expressing the rat sIL-6R. Different cell lines infected with this adenoviral vector express the biologically active transgene in a transient but sustained manner. Using this system, we were able to obtain, in rabbits, specific antibodies directed against gp54 and to develop an assay to measure sIL-6R concentrations. Rats infected with the recombinant virus show an increase in sIL-6R concentrations lasting at least 10 days that is not associated with a change in acute phase proteins level either at basal level or after a turpentine challenge. In lungs, after intra-tracheal injection, an increase in the concentrations of both IL-6 and sIL-6R induces a fibrotic like inflammatory response while an elevated level of sIL-6R alone does not seem to modify the lung histological aspect. Surprisingly, specific antibodies against sIL-6R have agonistic or antagonistic activities depending on the cell types. This last point likely indicates cell type difference in IL-6 transduction pathway.

Key words: interleukin-6 - receptor - expression system - adenovirus - inflammation - signal - rat - cytokine - acute phase reaction - fibrosis

Résumé

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine douée de nombreuses propriétés tant sur les plans hématologique et immunologique que de la réaction inflammatoire. Ses effets sont médiés par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire composé de deux glycoprotéines, la chaîne α , ou gp 80, spécifique de l'IL-6 et la chaîne β , ou gp130, nécessaire à la transduction du signal. Une forme soluble du récepteur (sIL-6R), ou gp54, possède *in vitro* des propriétés agonistes contrairement à de nombreux autres récepteurs solubles de cytokines décrits comme régulateurs négatifs. Les effets du sIL-6R *in vivo* ne sont pas connus et nous avons développé un modèle animal chez le rat permettant l'étude de cette protéine. Nous avons généré un récepteur soluble recombinant (rsIL-6R) par expression de la partie extracellulaire du récepteur à l'IL-6 dans deux systèmes d'expression: *E. coli* et baculovirus. Ces protéines possèdent des activités biologiques similaires et confirment *in vitro* le rôle agoniste du sIL-6R lorsqu'associé à son ligand. Nous avons développé un adénovirus recombinant, réplication déficient, exprimant le récepteur soluble à l'IL-6 de rat. Ce vecteur permet, après infection de différentes lignées cellulaires, l'expression transitoire et soutenue de la protéine recombinante biologiquement active. Ce système a permis la production, chez le lapin, d'anticorps spécifiques dirigés contre le rsIL-6R. Ceux ci ont permis la mise au point d'une méthode de dosage ELISA du récepteur soluble et nous avons démontré que l'adénovirus recombinant induisait l'élévation de la concentration de cette protéine chez le rat pendant plus de dix jours. L'effet de cette augmentation transitoire systémique ne modifie pas la concentration des protéines de la phase aiguë que ce soit à l'état basal ou après induction. Au niveau pulmonaire, après injection intra-trachéale, une augmentation du sIL-6R et de son ligand induit une intense réponse inflammatoire à caractère fibrosant spécifique. *In vitro*, les anticorps dirigés contre le récepteur possèdent une activité variable selon les cellules étudiées. Cette dernière observation dénote une différence de la transduction du signal selon les cellules.

Mots clés: Interleukine-6 - récepteur - gp130 - expression - adénovirus - inflammation - cytokine - rat - signal - réaction de la phase aiguë - fibrose