



**HAL**  
open science

**Analyse de l'expression d'une nouvelle cytokine,  
l'interleukine-27, dans les lymphocytes normaux et  
tumoraux et de son rôle au cours de la différenciation  
lymphocytaire B normale**

Frédérique Larousserie

► **To cite this version:**

Frédérique Larousserie. Analyse de l'expression d'une nouvelle cytokine, l'interleukine-27, dans les lymphocytes normaux et tumoraux et de son rôle au cours de la différenciation lymphocytaire B normale. Immunologie. Université René Descartes - Paris V, 2005. Français. NNT: . tel-00101553

**HAL Id: tel-00101553**

**<https://theses.hal.science/tel-00101553v1>**

Submitted on 27 Sep 2006

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

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

***FACULTÉ DE MEDECINE RENE DESCARTES PARIS 5***

Ecole Doctorale Gc2ID

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

**Discipline : Immunologie**

présentée et soutenue publiquement  
par

**Frédérique LAROUSSERIE**

le 14 Décembre 2005

**Analyse de l'expression d'une nouvelle cytokine, l'interleukine-27,  
dans les lymphocytes normaux et tumoraux  
et de son rôle au cours de la différenciation lymphocytaire B normale**

Directeur de thèse : **Dr Odile DEVERGNE**

**JURY**

**Dr Nadine CERF-BENSUSSAN**  
**Dr Jean-Christophe BORIES**  
**Pr Philippe GAULARD**  
**Dr Roman KRZYSIEK**  
**Dr Anne DURANDY**  
**Dr Odile DEVERGNE**

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

Je tiens en premier lieu à remercier le Docteur Michel Dy pour m'avoir accueillie au sein de l'unité CNRS UMR 8147.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Odile Devergne, mon directeur de recherche, pour ses grandes qualités scientifiques et humaines.

Je remercie le Docteur Jean-Christophe Bories et le Professeur Philippe Gaulard pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également le Docteur Nadine Cerf-Bensussan pour bien voulu être président du jury.

Je tiens également à remercier le Docteur Anne Durandy et le Docteur Roman Krzysiek pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je remercie vivement le Professeur Nicole Brousse (service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Necker-Enfants Malades) et toute son équipe pour m'avoir permis de réaliser les techniques d'analyse *in situ* dans son laboratoire.

Je remercie également le Professeur Yves Manach et son service (service d'Otorhinolaryngologie pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades) pour les amygdales.

Un grand merci à Emilie Bardel pour son aide au quotidien. Merci également à Pascaline Charlot qui a repris le sujet avec enthousiasme et efficacité.

Sans oublier de nombreux membres du laboratoire pour les discussions sympathiques, scientifiques ou non ...

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AID : « activation-induced cytidine deaminase »  
aa : acide aminé  
Ac : anticorps  
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
Ag : antigène  
AP1 : « activator protein 1 »  
ARN : acide ribonucléique  
ATL : « adult T-cell leukemia/lymphoma »  
ATM : « ataxia telangiectasia mutated »  
BARTs : « BamA rightward transcripts »  
BCR : « B-cell receptor »  
BLIMP : « B lymphocyte-induced maturation protein »  
CBD : « cytokine binding domain »  
CD : « cluster of differentiation »  
CG : centre germinatif  
CLC : « cardiotrophin-like cytokine »  
CLF : « cytokine-like factor »  
CLMF : « cytotoxic lymphocyte maturation factor »  
CNTF(R) : « ciliary neurotrophic factor (receptor) »  
CREB : « cyclic AMP-responsive element-binding protein »  
CRTH2 : « chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells »  
CT : « cardiotrophin »  
CTAR : « C-terminal activating region »  
EBER : « Epstein-Barr virus small RNA »  
EBI3 : « EBV-induced gene 3 »  
EBNA : « EBV nuclear antigen »  
EBV : « Epstein-Barr virus »  
ELISA : « enzyme-linked immunosorbent assay »  
FGFR : « fibroblast growth factor receptor »  
G-CSF : « granulocyte colony-stimulating factor »  
GM-CSF : « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »  
HAM : « HTLV-1-associated myelopathy »  
HTLV-1 : « Human T-cell leukemia virus type 1 »  
HRS : Hodgkin and Reed-Sternberg  
IFN : interféron  
Ig : immunoglobuline  
IL : interleukine  
IP-10 : « gamma interferon-inducible protein 10 »  
IRF4 : « interferon regulatory factor »  
Jak : Janus kinase  
JNK : « c-jun N-terminal kinase »  
kDa : kiloDalton  
KO : « knock out »  
LIF : « leukemia inhibitory factor »  
LLC : leucémie lymphoïde chronique  
LMP : « latent membrane protein »  
LPS : lipopolysaccharide  
LTR : « long terminal repeat »

M : manteau  
M-CSF : « macrophage colony-stimulating factor »  
MALT : « mucosa-associated lymphoid tissue »  
MDC : « macrophage-derived chemokine »  
MIG : « monokine induced by interferon gamma »  
MIP : « macrophage inflammatory protein »  
MUM1 : « multiple myeloma oncogene 1 »  
NF-κB : « nuclear factor κB »  
NGFR : « nerve growth factor receptor »  
NK : « natural killer »  
NKSF : « natural killer cell stimulating factor »  
OMS : organisation mondiale de la santé  
OSM : oncostatine M  
PAX5 : « paired box gene 5 »  
PCR : « polymerase chain reaction »  
PHA : phytohémagglutinine  
RAG : « recombinase activating gene »  
RANKL : « receptor activator of NF-κB ligand »  
RANTES : « regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted »  
Rb : rétinoblastome  
RE : réticulum endoplasmique  
RT-PCR : « reverse transcription-polymerase chain reaction »  
SAC : « *staphylococcus aureus* Cowan strain »  
SOCS : « suppressors of cytokine signalling »  
SRF : « serum responsive factor »  
STAT : « signal transducer and activator of transcription »  
TARC : « thymus- and activation-regulating chemokine »  
TCCR : « T-cell cytokine receptor »  
TCR : « T-cell receptor »  
TEASRL : « T-cell expressed activating specific receptor ligand »  
TES : « transformation effector site »  
TGF : « tumor growth factor »  
TIA1 : « T-cell intracellular antigen »  
TNF(R) : « tumor necrosis factor (receptor) »  
TRADD : « TNF receptor-associated death domain protein »  
TRAF : « TNF receptor-associated factor »  
Tyk : tyrosine kinase  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
ZC : zone claire  
ZS : zone sombre

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1. CYTOKINES HETERODIMERIQUES DE LA FAMILLE DE L'IL-12</b>	<b>4</b>
<b>1.1. L'IL-12</b>	<b>4</b>
Profil d'expression de l'IL-12	6
Récepteur de l'IL-12 et signalisation	7
Rôles de l'IL-12	8
Rôle de p40	10
<b>1.2. L'IL-23</b>	<b>10</b>
Profil d'expression	11
Récepteur de l'IL-23 : structure et profil d'expression ; transduction du signal	12
IL-23 et régulation de la réponse T et inflammatoire	13
IL-23 et lymphocytes B	15
<b>1.3. L'IL-27</b>	<b>16</b>
Identification et caractéristiques structurales d'EBI3	16
Mise en évidence de l'IL-27	17
Profil d'expression d'EBI3 et de l'IL-27	17
Récepteur de l'IL-27	18
Signalisation	20
Rôles de l'IL-27	20
<b>2. AUTRES CYTOKINES HETERODIMERIQUES</b>	<b>26</b>
<b>3. LYMPHOMAGENESE VIRO-INDUITE</b>	<b>29</b>
<b>3.1. L'EBV</b>	<b>29</b>
EBV et transformation	30
Rôle de LMP1 dans la transformation lymphocytaire B	31
Mécanisme d'induction de l'expression d'EBI3 par LMP1	32
Lymphoproliférations et lymphomes associés à l'EBV	33
Réponse immunitaire au cours des lymphoproliférations associées à l'EBV	37
<b>3.2. L'HTLV-1</b>	<b>39</b>
Mécanismes de transformation lymphocytaire T par l'HTLV-1 ; rôle de la protéine virale Tax	40
Réponse immunitaire au cours de l'infection par l'HTLV-1	42
<b>4. DIFFERENCIATION B ET LYMPHOMAGENESE B NON VIRO-INDUITE</b>	<b>42</b>
<b>4.1. DIFFERENCIATION B NORMALE</b>	<b>42</b>
Formation de la zone sombre du centre germinatif ; hypermutation somatique	43
Formation de la zone claire du CG ; sélection antigénique	45
Commutation isotypique	47
Transition cellule B du CG/plasmocyte	48

<b>4.2. LYMPHOMAGENESE B</b>	49
Evènements transformants	49
Cellule B normale d'origine	52
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	60
<b>RESULTATS</b>	62
<b>PARTIE I</b>	
Mise au point des conditions de détection de la sous-unité p28 de l'IL-27 en immunohistochimie	63
<b>PARTIE II</b>	
EBl3, IL-27 et lymphomes associés aux virus transformants EBV et HTLV-1	74
<b>PARTIE III</b>	
IL-27 et lymphocyte B humain: étude de l'expression et du rôle de l'IL-27 au cours de la différenciation lymphocytaire B normale et analyse de son expression dans les lymphomes B	90
<b>DISCUSSION</b>	153
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	164

# **INTRODUCTION**

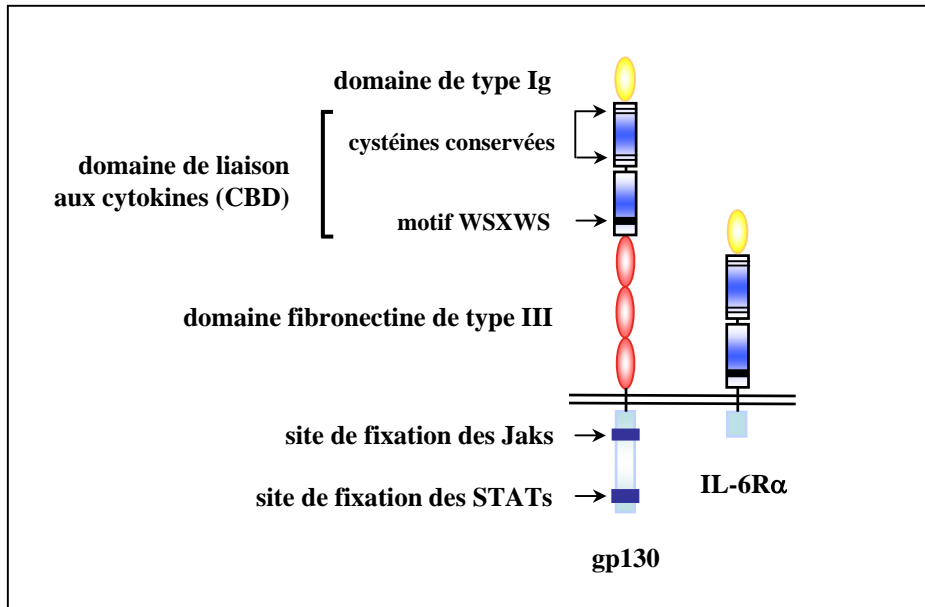


Les cytokines sont des médiateurs de la communication intercellulaire. Ce sont généralement des molécules de faible poids moléculaire, exprimées transitoirement, et qui agissent le plus souvent sur un mode autocrine ou paracrine. Elles sont impliquées dans la régulation de la survie cellulaire, la croissance, la différenciation, l'hématopoïèse et les réponses immunes innée et acquise.

Sur la base d'homologies structurales dans leur région extracellulaire, les récepteurs de cytokines ont été classés en plusieurs familles, parmi lesquelles les récepteurs de type I, également nommés récepteurs des hématopoïétines, les récepteurs de type II, correspondant initialement aux récepteurs des IFNs, et les récepteurs de la famille du TNFR, qui comprennent CD40 et le NGFR. Ainsi, les récepteurs de cytokines de type I possèdent dans la région extracellulaire un domaine conservé de 200 acides aminés environ, contenant dans la partie N-terminale deux paires de cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfure intramoléculaires, et dans la partie C-terminale un motif consensus (WSXWS) proche de la région transmembranaire. Ce domaine de 200 acides aminés, dérivé de deux domaines ancestraux de type fibronectine, est appelé domaine de liaison aux cytokines ou « CBD » pour « cytokine binding domain ». En plus de ce domaine caractéristique, les récepteurs de cytokines de type I peuvent comporter des domaines additionnels, comme des domaines de type fibronectine classiques ou des domaines de type immunoglobuline (Ig) (Figure 1) (Bazan, Proc Natl Acad Sci USA 1990).

En dépit des homologies de structure primaire partagées par les récepteurs de cytokines de type I, leurs ligands, les cytokines de type I ou hématopoïétines, ne partagent souvent pas d'homologie de séquence primaire évidente. C'est la mise en évidence d'une structure protéique tertiaire commune – quatre hélices  $\alpha$  anti-parallèles deux à deux – qui a révélé les similarités spatiales des cytokines de type I (Rozwarski, Structure 1994).

La plupart des complexes récepteurs de haute affinité des cytokines de type I sont composés d'au moins deux chaînes distinctes, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Le plus souvent, les sous-unités  $\alpha$  fixent spécifiquement la cytokine, alors que les sous-unités  $\beta$  participent à la formation d'un récepteur de haute affinité pour la cytokine et transduisent le signal. La chaîne



**Figure 1: Représentation schématique de la structure d'un récepteur de cytokines de type I : exemple du récepteur de haute affinité de l'IL-6**

de transduction est souvent commune à plusieurs cytokines. Elle peut définir des sous-familles fonctionnelles à l'intérieur de la famille des cytokines de type I. Ainsi les récepteurs des membres de la famille de l'IL-6, l'IL-6, l'IL-11, la cardiotrophine-1 (CT-1), le ciliary neurotrophic factor (CNTF), le leukemia inhibitory factor (LIF) et l'oncostatine M (OSM) partagent la chaîne gp130, et les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-2, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21, possèdent une chaîne commune, appelée  $\gamma_c$ .

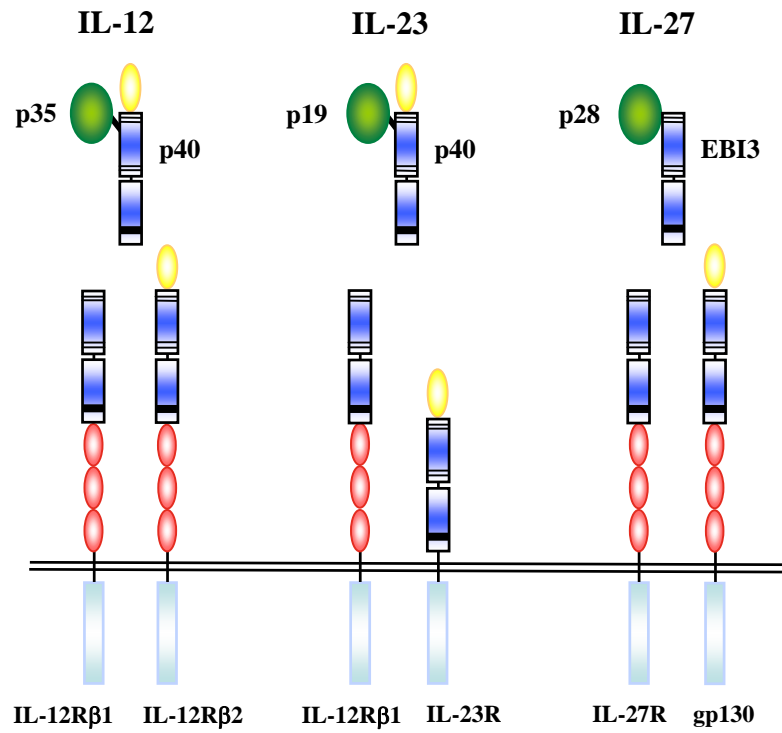
Les cytokines de type I transduisent un signal via la voie Janus kinase (Jak)- signal transducer and activator of transcription (STAT). Les protéines tyrosine kinases Jak, Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2 interagissent constitutivement avec les chaînes transductrices du signal des récepteurs, au niveau de sites d'ancrage localisés en tandem dans le domaine juxtamembranaire. La fixation des cytokines sur le complexe récepteur induit l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des chaînes de transduction, permettant la phosphorylation en trans des Jaks. Les Jaks activées phosphorylent des sites de fixation des facteurs de transcription STATs sur le récepteur, ce qui conduit à la fixation des STATs sur ce récepteur et leur phosphorylation par les Jaks. Les STATs activées se dimérisent, transloquent dans le noyau et se lient à leurs gènes cibles. Les STATs comptent 7 membres : STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6. Chaque cytokine active un profil particulier de STATs.

## **1. CYTOKINES HETERODIMERIQUES DE LA FAMILLE DE L'IL-12**

Dans la superfamille des cytokines de type I, on distingue une famille de cytokines atypiques par leur structure, la famille de l'IL-12. Cette famille comprend aujourd'hui trois membres, l'IL-12, l'IL-23 et l'IL-27 (Figure 2). Ces trois cytokines présentent des similarités, non seulement sur le plan structural, mais aussi sur le plan de leur profil d'expression et de leur fonction.

### **1.1. L'IL-12**

L'IL-12, en tant que premier membre décrit, constitue le prototype de cette famille. L'IL-12, anciennement appelée « natural killer cell stimulating factor » (NKSF) ou « cytotoxic



**Figure 2: Représentation schématique des cytokines de la famille de l'IL-12 et de leurs récepteurs**

lymphocyte maturation factor » (CLMF), a été identifiée par purification biochimique à partir du surnageant d'une lignée B infectée par le virus d'Epstein-Barr (EBV). C'est une cytokine de 70 kDa constituée de deux sous-unités liées de façon covalente par pont disulfure, p35 et p40 (Kobayashi, J Exp Med 1989). Le clonage des gènes codant l'IL-12 a révélé une structure particulière (Gubler, Proc Natl Acad Sci USA 1991 ; Wolf, J Immunol 1991). La sous-unité p35 possède la structure d'une cytokine de type I et est apparentée à l'IL-6 et au G-CSF. De façon surprenante, la sous-unité p40 ne présente pas une structure de cytokine, mais possède les caractéristiques structurales de la région extracellulaire d'un récepteur de cytokine de type I. p40 est homologue du CNTFR et de l'IL-6R, mais contrairement à ceux-ci, ne contient pas de séquence permettant un ancrage à la membrane plasmique et n'existe que sous forme soluble. Les gènes *p35* et *p40* sont situés sur des chromosomes différents, chez l'Homme sur les chromosomes 3 et 5. Toutefois, la co-expression des deux sous-unités dans une même cellule est nécessaire à la formation d'un hétérodimère fonctionnellement actif. Bien que p35 possède une séquence signal, elle n'est pas sécrétée seule, et sa sécrétion efficace requiert son association à la sous-unité p40 (Wolf, J Immunol 1991).

### ➤ Profil d'expression de l'IL-12

L'expression des deux sous-unités de l'IL-12 n'est pas toujours co-régulée. Au niveau ARN messager, *p35* est exprimé à un faible niveau dans de nombreux types cellulaires. Son expression est régulée sur le plan transcriptionnel et traductionnel. L'expression de *p40* est, quant à elle, restreinte à certains types cellulaires et est essentiellement régulée sur le plan transcriptionnel. p40 est souvent produite largement en excès par rapport à l'hétérodimère p35p40. L'IL-12 est produite principalement par les cellules présentatrices d'antigènes, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, après activation (D'Andrea, J Exp Med 1992 ; Macatonia, J Immunol 1995 ; Oppmann, Immunity 2000). D'autres types cellulaires tels que les polynucléaires neutrophiles et les cellules de la microglie expriment l'IL-12, après activation (revue in Trinchieri, Nat Rev Immunol 2003).

Les lignées B infectées *in vitro* par l'EBV produisent la sous-unité p40 de l'IL-12, et le plus souvent l'hétérodimère p35p40 après stimulation par des esters de phorbol. En ce qui concerne la production d'IL-12 par les lymphocytes B normaux, les résultats publiés sont sujet à controverse. Chez la Souris, si la présence des transcrits de *p35* et de *p40* dans les lymphocytes B a été observée dans certaines conditions (Oppmann, Immunity 2000), la production de la protéine IL-12 par les lymphocytes B n'a pas été détectée par d'autres (Guery, Eur J Immunol 1997). Chez l'Homme, une étude a montré la présence des transcrits de l'IL-12 dans les lymphocytes B humains fraîchement isolés à partir d'amygdale, à la fois dans les sous-populations naïves, du centre germinatif et « mémoire » (Airoidi, Cancer Res 2001). La production et la sécrétion d'IL-12 par les lymphocytes B naïfs et/ou « mémoire » stimulés via CD40, mais pas par les lymphocytes B du centre germinatif, a également été mise en évidence dans certaines conditions (Schultze, J Exp Med 1999).

#### ➤ Récepteur de l'IL-12 et signalisation

Le récepteur de haute affinité de l'IL-12 est constitué de deux chaînes  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , homologues de la chaîne gp130 (Chua, J Immunol 1994 ; Presky, Proc Natl Acad Sci USA 1996). La chaîne  $\beta 1$  est plus particulièrement impliquée dans la liaison à p40, et la chaîne  $\beta 2$  dans la liaison à p35. Le complexe récepteur de l'IL-12 est présent principalement à la surface des lymphocytes T activés et des cellules NK (Desai, J Immunol 1992). Il n'est pas exprimé à la surface des lymphocytes T naïfs. Les messagers des deux chaînes sont également détectés dans d'autres types cellulaires comme les cellules dendritiques (Grohmann, Immunity 1998) et les lymphocytes B humains (Airoidi, J Immunol 2000 ; Durali, Blood 2003).

Dans les lymphocytes T activés et les cellules NK, l'activation du récepteur de l'IL-12 entraîne la transphosphorylation de Tyk2 et de Jak2, l'activation de STAT4, et à un moindre degré celle de STAT1 et STAT3 (Bacon, J Exp Med 1995 ; Bacon, Proc Natl Acad Sci USA 1995 ; Jacobson, J Exp Med 1995). Une activation de STAT4 par l'IL-12 a également été observée dans les lymphocytes B humains isolés à partir du sang périphérique (Durali, Blood 2003), mais pas dans les lymphocytes B humains isolés à partir d'amygdales (Airoidi, J

Immunol 2000). Une des cibles majeures de STAT4 est le gène de l'IFN- $\gamma$ , acteur majeur de la réponse innée et acquise.

### ➤ Rôles de l'IL-12

#### *Rôles dans la réponse innée et acquise*

L'IL-12 joue un rôle important dans la régulation de la réponse immune innée par l'intermédiaire de son action sur les cellules NK. Au début de l'infection, l'IL-12 produite par les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques, agit en induisant la production par les cellules NK de nombreuses cytokines telles que le GM-CSF, le TNF- $\alpha$  et surtout l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  est un activateur puissant des fonctions antimicrobiennes des phagocytes et joue un rôle essentiel dans la défense contre de nombreuses bactéries, champignons et virus. De plus, l'IL-12 augmente l'activité cytotoxique des cellules NK en induisant la transcription des gènes codant les molécules associées aux granules cytotoxiques, tels que la perforine et les granzymes, et en augmentant l'expression de molécules d'adhésion (revue in Trinchieri, Nat Rev Immunol 2003).

L'IL-12 a également un rôle majeur dans la réponse immune acquise, en particulier dans l'induction de la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs dans la voie Th1 (Hsieh, Science 1993 ; Manetti, J Exp Med 1993). Sur la base de leur profil d'expression de cytokines et de leurs fonctions effectrices, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont été classés en lymphocytes Th1 ou Th2. Les lymphocytes Th1 produisent principalement de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et de la lymphotoxine, et jouent un rôle important dans la réaction d'hypersensibilité retardée et la défense contre les pathogènes intracellulaires. Les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, et sont impliqués dans l'immunité à médiation humorale et dans la réponse allergique. La différenciation et l'expansion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes Th1 ou Th2 sont influencées par l'environnement cytokinique dans lequel a lieu l'activation précoce de la cellule T, et résulte de l'équilibre des cytokines produites localement au cours de la phase inflammatoire de la réponse à l'infection. Ainsi, au moment

de l'expansion lymphocytaire T précoce, l'IL-12 induit la différenciation vers la voie Th1, alors que l'IL-4 induit la polarisation vers la voie Th2.

En plus de son action sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, l'IL-12 agit sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en stimulant la génération de lymphocytes T cytotoxiques et en augmentant leur activité cytotoxique.

Bien que ce rôle soit moins bien établi, quelques études ont montré une action directe de l'IL-12 sur les lymphocytes B. Une étude a montré que l'IL-12 présente un effet prolifératif faible et variable sur les lymphocytes B humains stimulés par *Staphylococcus aureus* (SAC), et qu'elle augmente la production d'IgS par les lymphocytes B stimulés par SAC et IL-2 (Jelinek, J Immunol 1995). Récemment, il a été montré que l'IL-12 active NF- $\kappa$ B, ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  dans les lymphocytes B naïfs humains (Airoldi, J Immunol 2000 ; Durali, Blood 2003).

#### *Rôle anti-tumoral de l'IL-12*

De nombreuses études montrent que l'IL-12 a une activité anti-tumorale. Chez la Souris, l'IL-12 peut empêcher l'apparition de différentes tumeurs induites (Noguchi, Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; Nanni, J Exp Med 2001) ou induire leur régression quand elles sont constituées (Brunda, J Exp Med 1993 ; Colombo, revue *in* Cytokine Growth Factor Rev 2002). Les mécanismes impliqués dans cette activité anti-tumorale sont complexes et font intervenir l'immunité innée et acquise. L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, des cellules NK et TNK serait souvent impliquée. L'action anti-tumorale de l'IL-12 s'exerce également via son action sur la production d'IFN- $\gamma$ . Ce dernier possède une action anti-tumorale propre par un effet toxique direct sur les cellules tumorales et par l'activation de mécanismes anti-angiogéniques.

En ce qui concerne les lymphomes B, Airoldi *et al* ont montré que certains types de lymphomes B présentent fréquemment une perte d'expression du transcrit de la chaîne  $\beta$ 2 du récepteur de l'IL-12 (Airoldi, J Clin Invest 2004). Ils ont également montré qu'*in vitro*, l'IL-12 inhibe la prolifération et induit l'apoptose de cellules tumorales B primaires et de lignées B



dans lesquelles l'expression de la chaîne  $\beta 2$  est induite. De plus, ils ont observé qu'*in vivo*, l'IL-12 réduit la tumorigénicité d'une lignée B dans laquelle la chaîne  $\beta 2$  est réexprimée, en augmentant l'apoptose et en diminuant la prolifération et la néoangiogenèse (Airoidi, J Clin Invest 2004). Ces résultats suggèrent que la perte de la réponse à l'IL-12 dans certaines lymphoproliférations B humaines est favorable à la progression de ces tumeurs.

### ➤ Rôle de p40

Chez la Souris, p40 peut être produite sous forme d'homodimères p40p40, qui constituent un antagoniste de l'IL-12, *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, chez l'Homme, des homodimères p40p40 ne sont pas produits en conditions physiologiques et bien qu'un rôle antagoniste ait été mis en évidence *in vitro*, un rôle antagoniste *in vivo* est peu probable (revue in Trinchieri, Nat Rev Immunol 2003).

## 1.2. L'IL-23

Une dizaine d'années après l'identification de l'IL-12, une nouvelle cytokine hétérodimérique apparentée à l'IL-12 a été mise en évidence. Cette cytokine, appelée IL-23, est constituée d'une nouvelle molécule présentant une structure de cytokine de type I à 4 hélices  $\alpha$ , la sous-unité p19, et de la sous-unité p40 de l'IL-12 (Oppmann, Immunity 2000).

La molécule p19 a été identifiée par recherche d'homologie avec les membres de la famille de l'IL-6 par analyse bioinformatique. p19 présente la plus forte homologie structurale avec p35, le G-CSF et l'IL-6. Alors que p19 possède une séquence de type peptide signal, elle n'est pas sécrétée seule chez l'Homme, et est sécrétée à un niveau très faible chez la Souris. Comme p35, la sécrétion efficace de p19 nécessite son association à la sous-unité p40 de l'IL-12. p19 n'est en revanche pas sécrétée quand elle est co-exprimée avec d'autres formes solubles de récepteur de cytokine, telles qu'EBI3, l'IL-6R soluble ou CLF-1. Les deux protéines, p19 et p40, sont liées de façon covalente, par pont disulfure (Oppmann, Immunity 2000).

Cette mise en évidence d'une nouvelle cytokine hétérodimérique partageant la sous-unité p40 de l'IL-12 était inattendue, et a conduit à reconsidérer certains travaux réalisés sur l'IL-12. En effet, de nombreuses études visant à définir les fonctions de l'IL-12 avaient été réalisées avec des souris p40<sup>-/-</sup> ou à l'aide d'anticorps neutralisants anti-p40, ne permettant pas de différencier un effet de l'IL-12, d'un effet de l'IL-23.

### ➤ Profil d'expression

Afin d'identifier les principaux tissus et types cellulaires produisant l'IL-23, le profil d'expression de *p19* a été étudié en parallèle à celui de *p40* par RT-PCR quantitative à partir de banques d'ADNc de souris (Oppmann, Immunity 2000). Cette étude a montré que l'ARN messager de *p19* est exprimé dans des types cellulaires et des tissus variés (expression la plus forte dans certains organes lymphoïdes comme les plaques de Peyer de l'intestin grêle et le thymus), et que son profil d'expression n'est pas strictement superposable à celui de *p40*. Une co-expression de *p19* et *p40* est principalement observée dans les cellules dendritiques et les macrophages, dans certaines conditions. En effet, les deux gènes sont co-exprimés, après activation, dans les cellules dendritiques dérivées *in vitro* de monocytes du sang périphérique, ainsi que dans les macrophages issus de la moelle osseuse activés par le LPS et dans des lignées macrophagiques activées ou non par le LPS. Le messager de *p19* est également fortement exprimé dans des lymphocytes T polarisés Th1 ou Th2, et dans les cellules endothéliales activées par le TNF- $\alpha$ . Cependant, dans ces deux types cellulaires, le messager de *p40* n'est pas détecté. Le messager de *p19* n'est pas détecté dans la rate, ni dans les lymphocytes B spléniques activés par le LPS.

L'expression de *p19* dans les cellules dendritiques murines apparaît finement régulée. En effet, si son expression est détectée dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes du sang périphérique, elle n'est, a contrario, pas détectée dans les cellules dendritiques fraîchement isolées à partir de la moelle osseuse ou de la rate, ni dans les cellules dendritiques dérivées *in vitro* de cellules de la moelle osseuse (Oppmann, Immunity 2000).

Chez l'Homme, une forte expression de *p19* et de *p40* est détectée dans les cellules dendritiques dérivées *in vitro* de monocytes du sang périphérique, activées via CD40 en présence de TNF- $\alpha$  et de LPS. Chez l'Homme comme chez la Souris, ces cellules dendritiques dérivées de monocytes du sang périphérique produisent et sécrètent l'hétérodimère p19p40 (Oppmann, Immunity 2000). Par ailleurs, les messagers de *p19* et de *p40* ont été détectés dans les monocytes humains après activation par le LPS et l'IFN- $\gamma$  (la Sala, J Immunol 2005), et après exposition à *Candida albicans* (Kim, Infect Immunol 2005).

En ce qui concerne le profil d'expression de l'IL-23 en immunopathologie humaine, peu de données sont connues. Récemment, il a été montré une augmentation de l'expression du messager de *p19* dans des lésions cutanées de psoriasis chez l'Homme. La combinaison de l'étude de l'expression de la protéine p40 *in situ* par immunohistochimie et de l'analyse par RT-PCR des messagers de *p19* et de *p40* montre que les cellules qui produisent l'IL-23 dans les lésions cutanées de psoriasis sont des cellules du derme exprimant des marqueurs de cellules dendritiques (Lee, J Exp Med 2004).

Dans un modèle de souris transgénique exprimant un transgène luciférase sous la dépendance du promoteur de *p40*, un haut niveau d'activation constitutive du transgène a été observé dans l'iléon terminal (Becker, J Clin Invest 2003). A cette expression du transgène est associée l'expression du transcrit endogène de *p40*, ainsi que l'expression des protéines p40 et de p19p40. Cette expression est dépendante de la présence de germes dans la lumière iléale, suggérant un rôle de la flore intestinale dans la régulation de l'expression de *p40*. Les cellules produisant p40 correspondent à des cellules dendritiques de la lamina propria (Becker, J Clin Invest 2003).

#### ➤ Récepteur de l'IL-23 : structure et profil d'expression ; transduction du signal

Le complexe récepteur de l'IL-23 est constitué de la chaîne  $\beta 1$  du récepteur de l'IL-12 et d'une deuxième chaîne spécifique nommée IL-23R (Parham, J Immunol 2002). L'IL-23R est un nouveau récepteur de la superfamille des récepteurs de cytokines de type I. Chez l'Homme, son gène est situé sur le chromosome 1 à proximité du gène de l'IL-12R $\beta 2$ . Sur le

plan structural, la protéine IL-23R est le plus fortement homologue de l'IL-12R $\beta$ 2 et de gp130. Le domaine extracellulaire de l'IL-23R comporte un domaine N-terminal de type Ig, mais pas de domaine de type fibronectine contrairement à l'IL-12R $\beta$ 2. L'IL-23R contient un variant du motif consensus WSXWS, le motif WQPWS. La chaîne IL-12R $\beta$ 1, seule, est capable de lier l'IL-23, mais ne permet pas la réponse à celle-ci, cette réponse étant conférée par la co-expression des deux chaînes IL-12R $\beta$ 1 et IL-23R (Parham, J Immunol 2002).

Chez l'Homme, le profil d'expression de la chaîne IL-23R se superpose en partie à celui de la chaîne IL-12R $\beta$ 2 (analyse par RT-PCR quantitative). Le récepteur de l'IL-23 est exprimé par les lymphocytes T (clones Th0 et Th1) et les cellules NK, et à un très faible niveau par les monocytes et les cellules dendritiques (Parham, J Immunol 2002).

La fixation de l'IL-23 sur son récepteur de haute affinité active en partie les mêmes molécules de la famille Jak/STAT que l'IL-12 : Jak2, Tyk2 et STAT1, -3, -4 et -5 (Parham, J Immunol 2002). Cependant, contrairement à l'IL-12 qui induit principalement la phosphorylation de STAT4, l'IL-23 induit principalement la phosphorylation de STAT3 (études dans des lignées T et NK, et dans des lymphocytes T activés par la PHA) (Parham, J Immunol 2002 ; Oppmann, Immunity 2000).

### ➤ **IL-23 et régulation de la réponse T et inflammatoire**

Chez la Souris, l'IL-23 induit fortement la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> « mémoire » activés par anticorps anti-CD3 en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-2, mais est sans effet sur la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Oppmann, Immunity 2000). Chez l'Homme, les effets prolifératifs de l'IL-23 sont légèrement différents, dans la mesure où l'IL-23 augmente non seulement la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> « mémoire » activés par anticorps anti-CD3 et anti-CD28, mais également celle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs activés dans les mêmes conditions, bien que l'effet soit moins marqué sur ces derniers (Oppmann, Immunity 2000).

L'IL-23 induit la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T humains du sang périphérique activés par la PHA. Cet effet de l'IL-23 sur la production d'IFN- $\gamma$  s'exerce

principalement sur les lymphocytes T « mémoire » (CD45RO<sup>+</sup>) activés par anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Oppmann, Immunity 2000).

Ces premiers résultats ont suggéré un rôle important de l'IL-23 dans le maintien de la réponse Th1 mémoire et dans la production d'IFN- $\gamma$  (Oppmann, Immunity 2000). Cependant, une étude ultérieure utilisant des souris p19<sup>-/-</sup> n'a pas montré d'anomalie dans le développement de la réponse Th1, ni dans la production d'IFN- $\gamma$  au cours de l'infection aiguë par *Toxoplasma gondii* (Lieberman, J Immunol 2004), ce qui suggère que l'IL-23 n'est pas indispensable aux réponses Th1.

Plus récemment, il a été montré que l'IL-23 joue un rôle majeur dans le développement d'une nouvelle population cellulaire T CD4<sup>+</sup> dont le profil d'expression cytokinique est différent de celui des lymphocytes différenciés Th1 ou Th2, et est caractérisé en particulier par la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-17 (Langrish, J Exp Med 2005). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spléniques murins « mémoire », et non les naïfs, produisent de l'IL-17 en réponse à la stimulation par l'IL-23 (Aggarwal, J Biol Chem 2003). Cette production d'IL-17 en réponse à l'IL-23 est inhibée en présence d'IL-12, qui semble exercer un rétrocontrôle négatif sur la production de l'IL-17 en réponse à l'IL-23.

L'IL-23, en partie via son action sur la production d'IL-17, joue un rôle majeur *in vivo* dans les réponses inflammatoires chroniques auto-immunes. L'implication de l'IL-23 dans la survenue de pathologies auto-immunes a été mise en évidence *in vivo* chez la Souris dans un modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale (Cua, Nature 2003) et dans un modèle d'arthrite inflammatoire chronique, l'arthrite induite par le collagène (Murphy, J Exp Med 2003). L'encéphalite auto-immune expérimentale est une maladie auto-immune du système nerveux central médiée par les lymphocytes T polarisés Th1 et par les macrophages. Les souris déficientes pour p19 ou pour p40 ne développent pas la maladie contrairement aux souris déficientes pour p35. La réexpression locale de l'IL-23 par technique de transfert de gènes rétablit la susceptibilité des souris p19<sup>-/-</sup> et p40<sup>-/-</sup>, ce qui indique que l'IL-23, et non l'IL-12, est nécessaire au développement de cette affection. L'arthrite induite par le collagène

est un modèle murin de la polyarthrite rhumatoïde, maladie auto-immune humaine. Son développement dépend à la fois des réponses immunes cellulaire et humorale. Comme pour l'encéphalite auto-immune, les souris p19<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'arthrite alors que les souris p35<sup>-/-</sup> développent la maladie comme les souris sauvages, avec une augmentation des messagers de protéines pro-inflammatoires telles que l'IL-17 et le TNF- $\alpha$ . Dans les ganglions lymphatiques de drainage, il existe une augmentation du nombre des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> producteurs d'IL-17, alors que cette population n'est pas retrouvée dans la souris p19<sup>-/-</sup>.

### ➤ IL-23 et lymphocytes B

Une étude du profil d'expression de l'IL-23R par RT-PCR quantitative chez l'Homme a montré que cette chaîne n'est pas détectée dans les splénocytes au repos ou après activation, et est exprimée à un niveau faible par les lymphocytes B transformés *in vitro* par l'EBV, ces derniers exprimant aussi faiblement l'IL-12R $\beta$ 1 (Parham, J Immunol 2002). Chez la Souris, l'expression des messagers de l'IL-23R et de l'IL-12R $\beta$ 1 n'est pas détectée dans les lymphocytes B spléniques activés par le LPS. Ces résultats suggèrent une expression nulle ou très faible du récepteur de haute affinité de l'IL-23 dans les lymphocytes B, en dehors de la transformation par l'EBV.

Une étude récente de la réponse humorale des souris p19<sup>-/-</sup> confirme l'hypothèse d'un rôle peu important de l'IL-23 sur les lymphocytes B. En effet, ces souris répondent normalement à une stimulation antigénique T indépendante (Ghilardi, J Immunol 2004). De plus, les lymphocytes B des souris p19<sup>-/-</sup> prolifèrent normalement en réponse à la stimulation par le LPS, ou par des anticorps anti-CD40 ou anti-IgM. Ils ne présentent pas de défaut de commutation de classe en réponse à l'IL-4. Les auteurs ont recherché un potentiel effet direct de l'IL-23 sur les lymphocytes B murins : l'IL-23 n'a pas d'effet sur la prolifération des lymphocytes B, ni sur la commutation de classe (Ghilardi, J Immunol 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que l'IL-23 n'a pas d'action directe sur les lymphocytes B.

### 1.3. L'IL-27

L'IL-27 est la plus récemment décrite des cytokines de la famille de l'IL-12. Elle est formée par l'association de la protéine EBV-induced gene 3 (EBI3) et du ligand p28 (Pflanz, Immunity 2002).

#### ➤ Identification et caractéristiques structurales d'EBI3

*EBI3* a été identifié sur la base de son induction par l'EBV, par criblage de banque différentiel entre une lignée Burkitt infectée par l'EBV, la lignée BL41/B95.8, et la lignée parentale EBV BL41 (Devergne, J Virol 1996). Chez l'Homme, *EBI3* est localisé sur le chromosome 19 (bande p13.3), à proximité du récepteur de l'érythropoïétine et de Tyk2.

EBI3 possède les particularités structurales caractéristiques des membres de la famille des récepteurs de cytokines de type I, à savoir la présence de deux paires de cystéines conservées dans la portion N-terminale et un motif LSDWS, variant du motif consensus WSXWS dans la portion C-terminale. Au sein des récepteurs de cytokines de classe I, EBI3 est plus fortement homologue du CNTFR $\alpha$  (30% d'identité en aa) et de la sous-unité p40 de l'IL-12 (27% d'identité en aa). Comme p40, EBI3 ne possède pas de séquence d'ancrage à la membrane plasmique et correspond à la partie extracellulaire soluble d'un récepteur de cytokine de type I. EBI3 est une protéine fortement glycosylée. Sa forme intracellulaire est de 33 kDa, et sa forme sécrétée de 34 kDa, les différentes de taille étant vraisemblablement dues à des glycosylations différentes. Une grande fraction des molécules EBI3 est retenue dans le réticulum endoplasmique (RE). Dans ce compartiment, EBI3 s'associe avec la calnexine, molécule chaperon résidente du RE qui s'associe à de nombreuses glycoprotéines, et joue un rôle clé dans l'assemblage des complexes multiprotéiques en s'associant aux molécules non encore assemblées et en les retenant dans le RE jusqu'à assemblage. EBI3 ne possède que les quatre cystéines conservées impliquées dans la formation de ponts disulfure intramoléculaires, et ne dispose donc pas d'un autre résidu cystéine pouvant être impliqué dans une liaison covalente avec un autre partenaire, du type de l'association p35p40. Toutefois, il a été montré qu'EBI3 s'associe à la sous-unité p35 de l'IL-12, de façon non

covalente, pour être sécrétée sous la forme d'un hétérodimère EB13p35 (Devergne, Proc Natl Acad Sci USA 1997). La co-expression d'EB13 et de p35 restaure une sécrétion plus efficace, de p35 et d'EB13. L'activité biologique de cette molécule hétérodimérique n'a pas encore été démontrée.

#### ➤ **Mise en évidence de l'IL-27**

De même que p19, p28 a été identifiée par le groupe de Rob Kastelein (DNAX Research Institute, Palo Alto, USA) par bioinformatique, par recherche d'homologie structurale avec les membres de la famille de l'IL-6 (Pflanz, Immunity 2002). Parmi les cytokines de cette famille, p28 est la plus proche de l'IL-11 et de CLC. De façon similaire à l'IL-12 p35 et à l'IL-23 p19 qui ne peuvent être sécrétées indépendamment de leur association à p40, p28 requiert l'association à EB13 dans une même cellule pour être sécrétée. p28 n'est pas sécrétée quand elle est co-exprimée avec l'IL-12 p40, le récepteur soluble de l'IL-11 ou CLF-1 (Pflanz, Immunity 2002). L'association entre p28 et EB13 est non covalente.

#### ➤ **Profil d'expression d'EB13 et de l'IL-27**

*EB13* est exprimé à un très haut niveau dans des lignées de lymphome de Burkitt EBV infectées *in vitro* par l'EBV et dans les lymphocytes B transformés *in vitro* par l'EBV. Par transfert de différents gènes de latence de l'EBV dans une lignée B EBV, il a été montré que l'expression d'EB13 est induite par la protéine de latence membranaire LMP1, mais pas par les protéines virales nucléaires EBNA2 ou EBNA3C (Devergne, J Virol 1996).

Dans les tissus humains, *EB13* présente un profil d'expression restreint. L'ARN messager d'*EB13* est détecté à un niveau faible dans les amygdales et à un niveau plus élevé dans la rate. Dans les tissus non hématopoïétiques testés, l'expression d'*EB13* n'avait été détectée que dans le placenta, où un très fort niveau d'expression est observé (Devergne, J Virol 1996). Le développement d'anticorps monoclonaux anti-EB13 a permis de montrer par immunohistochimie qu'EB13 est exprimée par les cellules syncytiotrophoblastiques et le



trophoblaste extra-villeux placentaires, et par ELISA qu'elle est présente à de très fortes concentrations dans le sérum des femmes enceintes (Devergne, Am J Pathol 2001).

Les premières études visant à déterminer le profil d'expression de l'IL-27 ont été réalisées par RT-PCR quantitative à partir de banques de cDNA humain et murin. Chez l'Homme et la Souris, la co-expression d'*EBI3* et de *p28* est essentiellement observée dans les cellules présentatrices d'Ag, les monocytes et les cellules dendritiques dérivées de monocytes, activées par le LPS. Dans ces dernières, les transcrits d'*EBI3* et de *p28* sont exprimés avec des cinétiques différentes. L'expression de *p28* est précoce et transitoire avec un pic d'expression maximale entre 3 et 6 heures et un retour au niveau basal après 24 heures de stimulation. L'expression d'*EBI3* est quant à elle légèrement différée avec un pic entre 12 et 24 heures. Elle décroît plus lentement avec un niveau d'expression encore significatif à 72 heures. La comparaison de cette cinétique d'expression à celle des deux gènes de l'IL-12, *p35* et *p40*, suggère que l'expression de l'IL-27 précéderait celle de l'IL-12. Le messager de *p28* est également détecté dans le placenta, mais à un niveau nettement inférieur à celui d'*EBI3* (Pflanz, Immunity 2002).

### ➤ Récepteur de l'IL-27

Le complexe récepteur de l'IL-27 est formé de deux chaînes, l'IL-27R et gp130 (Pflanz, Immunity 2002 ; Pflanz, J Immunol 2004). La chaîne IL-27R a été identifiée antérieurement à la mise en évidence de l'IL-27, par deux équipes indépendantes, sur la base d'homologies de séquence avec les récepteurs de cytokine de classe I, en particulier avec la chaîne gp130. Cette chaîne récepteur avait initialement été appelée TCCR ou WSX-1 (Sprecher, Biochem Biophys Res Commun, 1998 ; Chen, Nature 2000). L'IL-27R présente les caractéristiques structurales d'un récepteur de cytokine de classe I : un domaine de liaison aux cytokines contenant deux paires de cystéines conservées et un motif WGEWS similaire au motif consensus WSXWS, ainsi que 3 domaines de type fibronectine. Un motif de fixation des Jaks est présent dans la partie intracellulaire, à proximité du domaine transmembranaire. L'IL-27R présente 19% d'identité en aa avec la chaîne gp130 et 26% d'identité en aa avec la chaîne  $\beta 2$

du récepteur de l'IL-12 (Sprecher, Biochem Biophys Res Commun 1998 ; Chen, Nature 2000). Comme *EBI3*, *WSX-1* est situé sur le chromosome 19 (région p13.11) (Sprecher, Biochem Biophys Res Commun 1998).

Les premières études réalisées par Northern blot chez l'Homme avaient montré que les ARN messagers de l'*IL-27R* étaient présents dans tous les tissus testés, mais à un niveau plus élevé dans les tissus lymphoïdes tels que le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques, comparativement aux tissus non lymphoïdes (Chen, Nature 2000 ; Sprecher, Biochem Biophys Res Commun 1998). Par ailleurs, l'analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de l'*IL-27R* dans les différentes sous-populations de splénocytes murins avait montré que celui-ci est exprimé dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes B, les macrophages et les cellules NK, un plus fort niveau d'expression étant observé dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les cellules NK. Cette étude avait également montré que l'*IL-27R* est fortement exprimé dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Th0), mais que son expression diminue après différenciation en lymphocytes Th1 ou Th2 (Chen, Nature 2000).

La chaîne IL-27R peut lier l'IL-27, mais n'est pas capable, seule, de transduire un signal. Par expériences de complémentation par transfert génique dans la lignée murine BaF3, il a été montré que la deuxième chaîne nécessaire pour former avec l'IL-27R un complexe récepteur fonctionnel capable de transduire un signal est la chaîne gp130 (Pflanz, J Immunol 2004). La chaîne gp130 est partagée par les récepteurs de cytokines de la famille de l'IL-6. L'utilisation de la chaîne gp130 par le récepteur de l'IL-27, ainsi que des homologies structurales, ont conduit à regrouper les cytokines de la famille de l'IL-6 et celles de la famille de l'IL-12 en une superfamille, la famille IL-6/IL-12.

Lors de son clonage, *gp130* avait été décrit comme un gène exprimé de façon quasi ubiquitaire chez l'Homme et la Souris (Hibi, Cell 1990 ; Saito, J Immunol 1992). Une analyse récente réalisée par RT-PCR quantitative chez l'Homme a montré que les gènes codant pour les chaînes IL-27R et gp130 sont co-exprimés dans de nombreux types cellulaires, dont les monocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B, les cellules NK, les mastocytes et les cellules endothéliales (Pflanz, J Immunol 2004).

### ➤ Signalisation

Dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> murins, l'IL-27 active Jak1, Jak2 et Tyk2 (Kamiya, J Immunol 2004). En ce qui concerne le profil d'activation des STATs induit par l'IL-27 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs murins, des résultats contradictoires selon les équipes ont été rapportés. Ainsi, si plusieurs études montrent que l'IL-27 induit dans ces cellules la phosphorylation de STAT1, STAT3, et STAT5, et non celle de STAT6, des résultats discordants ont été observés pour STAT2 et STAT4, une activation faible ou nulle étant observée selon les études (Takeda J Immunol 2003 ; Villarino, Immunity 2003 ; Lucas, Proc Natl Acad Sci USA 2003 ; Kamiya, J Immunol 2004). Dans ces cellules, l'activation de STAT2 et de STAT5, mais non celle de STAT3, est dépendante de STAT1 (Kamiya, J Immunol 2004).

Chez l'Homme, l'IL-27 induit la phosphorylation de STAT1 et STAT3 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naïfs et dans les monocytes, ainsi que la phosphorylation de STAT3 dans les mastocytes (Hibbert, J Interferon Cytokine Res 2003 ; Pflanz, J Immunol 2004). Une activation de STAT1, STAT3, mais pas de STAT4, est observée en réponse à l'IL-27 dans la lignée NK humaine, NKL (Hibbert, J Interferon Cytokine Res 2003).

### ➤ Rôles de l'IL-27

#### *IL-27 et régulation de la réponse T*

Le premier rôle de l'IL-27 mis en évidence est son rôle dans l'initiation de la réponse Th1. En effet, les premières observations *in vitro*, ainsi que le phénotype des souris IL-27R<sup>-/-</sup> décrit antérieurement à la mise en évidence de l'IL-27, suggéraient que cette cytokine joue un rôle important dans les phases précoces de la réponse Th1.

Dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs murins et humains, l'IL-27 induit l'expression de T-bet (Takeda, J Immunol 2003 ; Hibbert, J Interferon Cytokine Res 2003 ; Lucas, Proc Natl Acad Sci USA 2003). T-bet est un facteur de transcription jouant un rôle clé dans l'initiation de la réponse Th1. Il est exprimé par les lymphocytes polarisés Th1 et est un puissant

transactivateur du gène de l'IFN- $\gamma$  (Szabo, Cell 2000 ; Mullen, Science 2001). A l'inverse, l'IL-27 réprime l'expression de GATA-3 (Lucas, Proc Natl Acad Sci USA 2003), facteur de transcription orientant la différenciation T vers la voie Th2 (Zheng, Cell 1997 ; Ouyang, Immunity 2000). De plus, dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs humains et murins, l'IL-27 induit l'expression de la chaîne  $\beta$ 2 du récepteur de l'IL-12, ce qui leur permet de répondre à l'IL-12 et de s'engager dans la voie de différenciation Th1 (Hibbert, J Interferon Cytokine Res 2003 ; Lucas, Proc Natl Acad Sci USA 2003 ; Takeda, J Immunol 2003 ). L'IL-27 induit également la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs murins et humains activés, mais est sans effet sur la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> « mémoire » (Pflanz, Immunity 2002). En synergie avec l'IL-12, l'IL-27 induit la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs humains et murins (Pflanz, Immunity 2002 ; Takeda, J Immunol 2003). Par l'utilisation de cellules de souris déficientes pour STAT1, il a été montré que l'effet de l'IL-27 sur la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs activés par anticorps anti-CD3 en présence d'un anticorps anti-IL-2 est indépendant de l'activation de STAT1, alors que l'effet de l'IL-27 sur l'induction de l'expression de T-bet et l'IL-12R $\beta$ 2, ainsi que son effet synergique avec l'IL-12 sur la production d'IFN- $\gamma$  par ces cellules, est dépendant de l'activation de STAT1 (Kamiya, J Immunol 2004).

Ces observations *in vitro* étaient en accord avec deux études, publiées antérieurement à la mise en évidence de l'IL-27, décrivant le phénotype des souris IL-27R<sup>-/-</sup> dans des modèles d'infection par des bactéries ou des parasites intracellulaires et mettant en avant un défaut d'initiation de réponse Th1 chez ces souris. En effet, les souris IL-27R<sup>-/-</sup> présentent une susceptibilité accrue à l'infection par *Listeria monocytogenes*, avec une charge bactérienne très élevée dans le foie (Chen, Nature 2000), et à l'infection par le parasite *Leishmania major* avec, au début de l'infection, un œdème et une ulcération sévères au site d'injection, associés à une charge parasitaire augmentée (Yoshida, Immunity 2001). Ces souris présentent aussi un défaut de formation des granulomes en réponse à l'infection par une mycobactérie, le bacille de Calmette et Guérin (Yoshida, Immunity 2001). Parallèlement, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés de ces souris présentent un défaut de production d'IFN- $\gamma$  (Chen, Nature 2000 ; Yoshida, Immunity 2001).

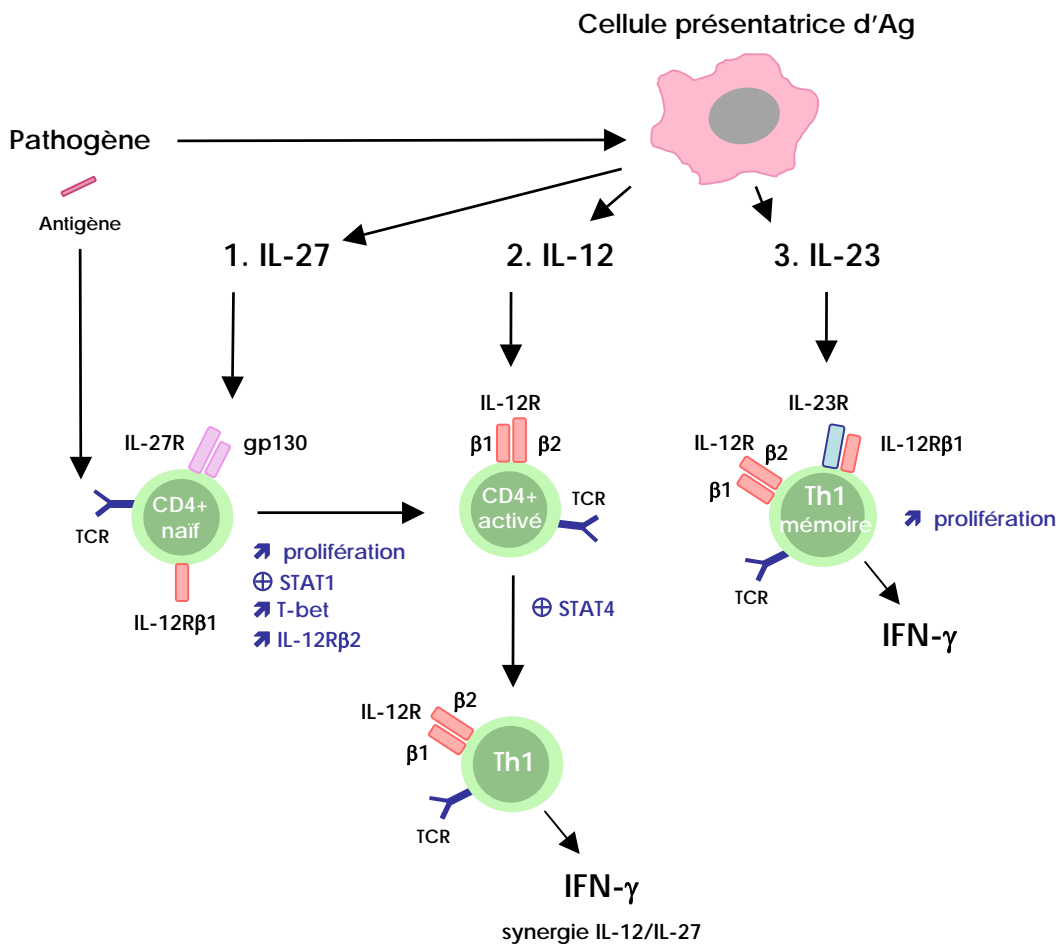
Ces premières études ont fourni la base d'un modèle où l'IL-27, en induisant l'expression de T-bet et de la deuxième chaîne du récepteur de l'IL-12, et en augmentant la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, constituait un inducteur précoce de la polarisation et de la différenciation lymphocytaire T dans la voie Th1, en permettant l'expansion des cellules T activées et leur conférant la capacité de répondre à l'IL-12, l'IL-23 agissant plus tardivement dans le maintien de la réponse T « mémoire » (Figure 3) (Trinchieri, Nat Rev Immunol 2003).

D'autres études, réalisées dans des modèles murins ou chez le Rat, ont conforté l'importance de l'axe IL-27/IL-27R dans le développement de la réponse Th1. Les souris IL-27R<sup>-/-</sup> présentent un défaut de réponse Th1 au cours de l'infection par d'autres pathogènes comme le parasite *Trichuris muris* (Bancroft, J Immunol 2004) et l'agent de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (Pearl, J Immunol 2004). Comme les souris IL-27R<sup>-/-</sup> dans l'étude de Yoshida et coll., les souris EB13<sup>-/-</sup> présentent une sensibilité accrue à l'infection par *Leishmania major* avec une charge parasitaire augmentée au début de l'infection (Zahn, Eur J Immunol 2005). De plus, un rôle direct de p28 dans la réponse Th1 a été mis en évidence à l'aide d'anticorps spécifiques: la neutralisation de la fonction de p28 *in vivo* inhibe la réponse Th1 dans le modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale murine (Goldberg, J Immunol 2004 a) et dans un modèle d'arthrite expérimentale chez le Rat (Goldberg, J Immunol 2004 b).

En plus d'un rôle dans le développement de la réponse Th1, quelques études indiquent également un rôle de l'axe IL-27/IL-27R dans l'inhibition de la réponse immune Th2. En effet, les souris IL-27R<sup>-/-</sup> présentent une exacerbation de la réponse Th2 dans un modèle d'infection par *Trichuris muris* (Artis, J Immunol 2004 a) et dans un modèle d'asthme allergique (Miyazaki, J Immunol 2005).

#### *Autres rôles de l'IL-27 ; rôle dans la réponse inflammatoire*

D'autres études ont montré que le rôle de l'IL-27 s'étendait au-delà de son rôle dans la réponse Th1/Th2.



D'après Trinchieri, Nat Rev Immunol 2003

**Figure 3: Rôle des cytokines de la famille de l'IL-12 dans le développement de la réponse Th1: première hypothèse de travail**

D'une part, la fonction de l'IL-27 ne se limite pas à ses effets directs sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. En effet, en dehors de ceux-ci, l'IL-27 exerce des effets directs sur d'autres types cellulaires, impliqués notamment dans la réponse inflammatoire et la réponse immune innée.

Ainsi, dans les monocytes humains, l'IL-27 augmente l'expression des messagers de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$ , et plus tardivement ceux de l'IL-12 p35 et de l'IL-18. De même, dans les mastocytes humains primaires issus de sang de cordon, l'IL-27 induit l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires des familles de l'IL-1 et du TNF, telles que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18, le TNF- $\alpha$ , OX40, TEASR-L et RANK-L (Pflanz, J Immunol 2004).

L'IL-27 agit également directement sur une autre population cellulaire, la cellule NK. Dans les cellules NK murines ou des lignées NK humaines, l'IL-12 induit l'expression de T-bet (Pflanz, Immunity 2002 ; Lucas, Proc Natl Acad Sci USA 2003 ). Seule, l'IL-27 n'a pas d'effet sur les cellules NK murines ou humaines en terme de prolifération ou de production d'IFN- $\gamma$ , et n'a pas d'effet sur l'activité cytotoxique des cellules NK murines (Pflanz, Immunity 2002 ; Lucas, Proc Natl Acad Sci USA 2003 ). Toutefois, en présence d'IL-2 et d'IL-12, l'IL-27 augmente la production d'IFN- $\gamma$  dans les cellules NK humaines (Pflanz, Immunity 2002).

D'autre part, après les observations initiales qui montraient un défaut de réponse Th1 des souris IL-27R<sup>-/-</sup> dans plusieurs modèles d'infection, plusieurs études ont obtenu des résultats opposés, montrant non seulement l'absence de défaut de réponse Th1 dans ces souris IL-27R<sup>-/-</sup>, mais aussi une réponse T et une réponse inflammatoire exacerbées et souvent fatales. Ainsi, au cours de l'infection prolongée par les parasites *Toxoplasma gondii* (Villarino, Immunity 2003) et *Trypanosoma cruzi* (Hamano, Immunity 2003), ainsi que par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Hölscher, J Immunol 2005), les souris IL-27R<sup>-/-</sup> développent une maladie inflammatoire sévère, caractérisée par une production excessive d'IFN- $\gamma$  et d'autres cytokines comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , associée à la persistance de cellules T CD4<sup>+</sup> activées après la phase aiguë de l'infection, et aboutissant au décès précoce de ces souris.

D'autres études vont également dans le sens d'un rôle régulateur, immunosuppresseur, de l'axe IL-27/IL-27R, en particulier sur les cellules TNK. Dans un modèle expérimental murin d'hépatite auto-immune, l'hépatite induite par la Concavaline A, il existe chez les souris IL-27R<sup>-/-</sup> une hyperproduction de cytokines proinflammatoires par les cellules TNK (Yamanaka, J Immunol 2004). A l'inverse, dans les souris EBI3<sup>-/-</sup>, les cellules TNK sont en nombre réduit et présentent un défaut de réponse à leur stimulus spécifique (Nieuwenhuis, Proc Natl Acad Sci USA 2002).

Ainsi, des résultats apparemment contradictoires ont été observés dans différents modèles utilisant les souris IL-27R<sup>-/-</sup>. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de ces différences. D'une part, les différents agents pathogènes utilisés mettent en jeu des réponses immunes différentes, en particulier en ce qui concerne les cytokines induites à l'initiation de la réponse immune. Le milieu cytokinique influence le rôle joué par l'IL-27 dans la réponse immune. C'est ainsi que le défaut de réponse Th1 observé dans certains modèles avec les souris IL-27R<sup>-/-</sup> dépend de la quantité d'IL-4 présente localement. Le défaut d'initiation de la réponse Th1 est majoré *in vivo* en présence d'IL-4, et *in vitro* en culture en conditions polarisantes neutres ou Th2 (Lucas, Proc Natl Acad Sci USA 2003 ; Artis, J Immunol 2004 b). D'autre part, les voies activées par l'IL-27 peuvent l'être également par d'autres cytokines. Par exemple, l'activation de STAT1 et l'induction de l'expression de l'IL-12Rβ2 peuvent être induites par l'IFN-α et l'IFN-γ, relativisant l'importance du rôle de l'IL-27 en fonction de l'environnement cytokinique (O'Shea, Cell 2002). En ce qui concerne le potentiel rôle immunosuppresseur de l'IL-27, il a été suggéré que celui-ci pourrait être médié par l'activation des SOCS (Villarino, Immunity 2003), mais aucun résultat ne permet d'étayer cette hypothèse.

Il faut souligner que l'ensemble des études proposant un rôle anti-inflammatoire de l'IL-27 ont été réalisées avec des souris transgéniques « knock-out », non pas pour p28 ou EBI3, mais pour le récepteur de l'IL-27. De plus, aucune étude n'a été réalisée en utilisant en parallèle les souris EBI3<sup>-/-</sup> et les souris IL-27R<sup>-/-</sup>. Compte tenu de la particularité des



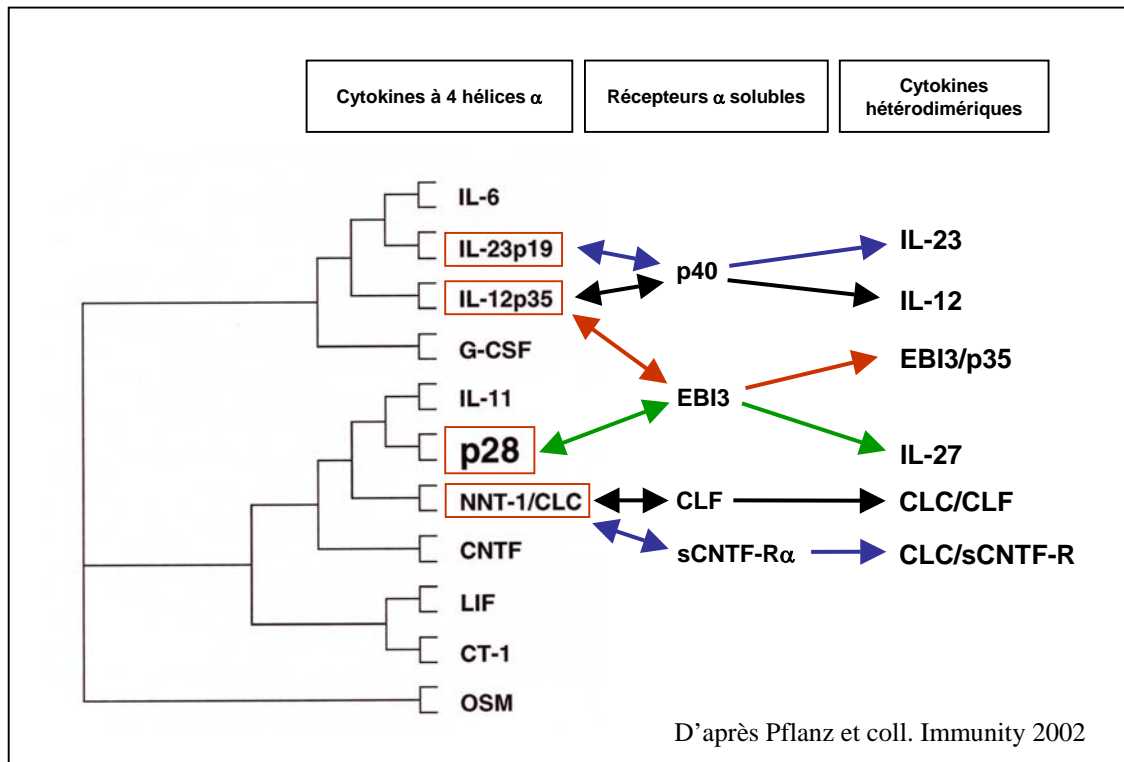
cytokines hétérodimériques et de leurs récepteurs, et en particulier de la capacité d'une même sous-unité du complexe cytokine ou du complexe récepteur à se lier à différents partenaires, il paraît imprudent d'affirmer que le phénotype des souris IL-27R<sup>-/-</sup> est uniquement dû à un défaut de réponse à l'IL-27, l'IL-27R possédant peut-être un autre ligand que l'IL-27. A l'heure actuelle, il n'existe pas de souris IL-27p28 KO, dont le phénotype serait intéressant à comparer avec celui des souris IL-27R<sup>-/-</sup> et EBI3<sup>-/-</sup>.

Ainsi, l'IL-27 est aujourd'hui considérée comme une cytokine immunomodulatrice capable à la fois de promouvoir les étapes précoces d'une réponse Th1 et de limiter la réponse Th2, mais aussi de contrôler l'intensité des réponses inflammatoires chroniques immunes. La prépondérance de l'une ou l'autre de ses fonctions est dépendante du pathogène, du site de l'infection, et des cellules effectrices de la réponse immune. Si les mécanismes impliqués dans le rôle pro-Th1 de l'IL-27 sont en partie connus, les mécanismes impliqués dans la fonction immunosuppressive supposée de l'IL-27 sont non complètement élucidés.

## **2. AUTRES CYTOKINES HETERODIMERIQUES**

En parallèle à la mise en évidence de l'IL-23 et de l'IL-27, il a été décrit deux autres cytokines hétérodimériques qui appartiennent à la famille de l'IL-6/IL-12 (Figure 4). Ces deux cytokines hétérodimériques impliquent la « cardiotrophin-like cytokine » (CLC), également appelée « novel neurotrophin-1 » (NNT-1) ou « B cell-stimulating factor 3 » (BSF-3).

La molécule CLC, cytokine de type I à 4 hélices  $\alpha$ , a été identifiée en 1999 par deux équipes différentes (Senaldi, Proc Natl Acad Sci USA 1999 ; Shi, Biochem Biophys Res Commun 1999). Il s'agit d'une protéine de 225 aa qui présente la plus grande homologie avec CT-1 et le CNTF. Le transcrit de CLC est principalement détecté au niveau tissulaire dans les ganglions lymphatiques et la rate, chez l'Homme et la Souris (Senaldi, Proc Natl Acad Sci USA 1999 ; Shi, Biochem Biophys Res Commun 1999). Bien que la protéine CLC possède une séquence signal, sa sécrétion nécessite son association à une autre molécule. Ainsi, CLC



**Figure 4: Cytokines de la famille de l'IL-6/IL-12.**

La parenté entre les cytokines à 4 hélices  $\alpha$ , déterminée par alignement de séquences par bioinformatique, est représentée sous forme d'un arbre.

peut être secrétée sous la forme d'un complexe hétérodimérique avec le cytokine-like factor (CLF). Le complexe CLC/CLF ainsi formé lie le complexe récepteur de haute affinité du CNTF, constitué des chaînes gp130, LIF-R $\beta$  et CNTFR $\alpha$  (Elson, Nat Neurosci 2000). Alternativement, CLC peut s'associer avec la forme soluble du CNTFR $\alpha$ , et se lier à un récepteur formé des chaînes gp130 et LIF-R $\beta$  (Plun-Favreau, EMBO J 2001). Dans les deux cas, les cytokines hétérodimériques ne sont pas liées par liaison covalente. Comme p40 et EBI3, CLF correspond sur le plan structural à la partie extracellulaire d'un récepteur de cytokine de type I, avec un domaine de liaison aux cytokines contenant deux paires de cystéines et le motif consensus WSXWS (Elson, J Immunol 1998). Contrairement au CNTFR $\alpha$  qui contient une région hydrophobe caractéristique d'un lien glycophosphatidylinositol, et de façon similaire à p40 et à EBI3, la protéine CLF ne contient pas de séquence d'ancrage à la membrane. Chez l'Homme, les transcrits de CLF sont exprimés dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse, thymus) et secondaires (ganglions lymphatiques, rate, appendice) ainsi que dans le placenta, l'estomac et le poumon fœtal (Elson, J Immunol 1998). *In vitro*, les hétérodimères CLC/CLF ou CLC/sCNTFR ont une action comparable à celle du CNTF : ils permettent la survie de motoneurones embryonnaires de rat (Elson, Nat Neurosci 2000 ; Plun-Favreau, EMBO J 2001). CLC/sCNTFR induit également la prolifération de lignées de neuroblastes de rat (Plun-Favreau, EMBO J 2001). Alors que le CNTF n'est pas une protéine sécrétée mais relarguée par des cellules endommagées (Sendtner, J Neurobiol 1994), CLC, associé au CNTF-R $\alpha$  ou au CLF, pourrait correspondre à un ligand sécrété du complexe récepteur du CNTF.

Alors que CLC ne semble pas sécrétée seule, son administration *in vivo* chez la Souris par voie intrapéritonéale ou son expression sous la dépendance du promoteur de l'apolipoprotéine E avec sécrétion dans la circulation générale, entraîne une hyperplasie B globale (Senaldi, Proc Natl Acad Sci USA 1999 ; Senaldi, J Immunol 2002). De plus, CLC présente des effets *in vitro* sur des cellules qui possèdent le récepteur du CNTF. Elle stimule efficacement la prolifération de la lignée B Raji, seule ou en synergie avec le CNTFR $\alpha$  soluble (Senaldi, J Immunol 2002) et d'une lignée myélomateuse (Burger, Br J Haematol 2003). CLC stimule aussi la prolifération de cellules B primaires murines activées par anti-

IgM et induit dans ces cellules la production d'IgM, IgG et IgA. Toutefois, dans cette étude, les concentrations en CLC utilisées étaient extrêmement élevées (15 µg/ml), et ces résultats sont sujet à caution.

### **3. LYMPHOMAGENESE VIRO-INDUITE**

#### **3.1. L'EBV**

L'EBV fait partie des virus herpès gamma. La primo-infection, le plus souvent inapparente, survient dans les trois premières années de vie, en particulier dans les pays en voie de développement, où quasiment 100% des enfants de 10 ans sont séropositifs pour l'EBV. Dans les pays occidentaux, seulement 50% des enfants de 10 ans sont séropositifs pour l'EBV. La primo-infection plus tardive, au cours de l'adolescence ou à l'âge adulte, peut se manifester par le développement d'une mononucléose infectieuse. Cette affection se manifeste par de la fièvre, une pharyngite, et des adénopathies. Elle est caractérisée par une charge virale élevée. Jusqu'à 1% (voire 10% dans certains cas) des cellules B du sang périphérique peuvent être infectées par l'EBV. Des études *in situ* des tissus lymphoïdes montrent qu'un nombre variable de cellules B sont infectées par l'EBV, dont de nombreuses présentent des signes de différenciation plasmocytaire (Niedobitek, J Pathol 1997). Chez le sujet immunocompétent, la réplication virale est contrôlée par une réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique intense, qui permet l'élimination de la plupart des cellules infectées. Environ 5% des adultes des pays occidentaux ne sont pas infectés par l'EBV.

L'EBV infecte les cellules épithéliales, les lymphocytes B et plus rarement les lymphocytes T. Le site primaire d'infection est l'oropharynx. Deux hypothèses co-existent quant à la cellule cible primaire de l'infection. Les premières études suggéraient que la cellule infectée est la cellule de l'épithélium oropharyngé, celui-ci étant permissif pour la réplication virale, permettant ainsi la dissémination des particules virales et l'infection secondaire des cellules B. Des résultats plus récents suggèrent que les cellules B infiltrant la muqueuse de l'oropharynx pourraient constituer la cible primaire d'infection, l'environnement local y

favorisant une infection lytique, plutôt que latente. En association à cette infection lytique observée dans l'oropharynx, une infection principalement latente des cellules B circulantes est observée. Cette infection latente d'un petit pool de cellules B persiste tout au long de la vie, le réservoir de l'EBV étant constitué par des cellules B « mémoire » au repos circulantes (Babcock, Immunity 1998). En plus de ces cellules EBV<sup>+</sup> « mémoire » circulantes, de rares cellules B infectées par l'EBV sont détectées dans les tissus lymphoïdes des sujets EBV<sup>+</sup> asymptomatiques : il s'agit principalement de cellules de petite taille situées dans les zones interfolliculaires (Niedobitek, Blood 1992).

### ➤ **EBV et transformation**

Bien que l'infection par l'EBV soit généralement bénigne, elle peut dans certains cas être associée au développement de pathologies tumorales: différents types de lymphomes, une forme particulière de carcinome, le carcinome indifférencié du naso-pharynx, ainsi que certaines formes de carcinomes gastriques.

*In vitro*, l'EBV est capable de transformer efficacement les cellules B en lignées lymphoblastoïdes infectées de façon latente par le virus. Dans les lignées lymphoblastoïdes, qui constituent le modèle d'infection *in vitro* par l'EBV de référence, les cellules expriment un nombre limité de protéines virales : six antigènes nucléaires (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C et LP) et trois protéines de latence membranaires (LMP1, 2A et 2B). Ce profil d'expression observé dans les lignées lymphoblastoïdes est nommé profil de latence de type III. Dans les lignées EBV<sup>+</sup> et les tumeurs liées à l'EBV, des profils de latence plus restreints, dits I et II, peuvent être observés. Dans le profil de latence de type II, les protéines EBNA1, LMP1 et LMP2 sont exprimées, alors que seule EBNA1 est exprimée dans le profil de type I. Dans ces 3 types de latence, de grandes quantités d'ARN viraux, EBER1 et EBER2, ainsi que les BARTs (BamHI-A rightward transcripts) sont également exprimés.

En plus de ces trois programmes de latence, un quatrième programme d'expression génique est utilisé au cours du cycle lytique du virus pour produire des particules virales infectieuses.

### ➤ Rôle de LMP1 dans la transformation lymphocytaire B

Parmi les protéines de latence de l'EBV, LMP1 joue un rôle majeur dans les processus d'immortalisation et de transformation. Cette protéine est une protéine membranaire, constituée d'un court domaine N-terminal intracytoplasmique de 24 aa, de six domaines transmembranaires et d'un domaine C-terminal intracytoplasmique de 200 aa. Cette protéine est constitutivement agrégée à la membrane plasmique sous forme de « patches ». Dans des lignées B dérivées de lymphomes de Burkitt EBV<sup>+</sup>, la seule expression de LMP1 s'accompagne de modifications phénotypiques comparables à celles observées lors de la transformation lymphocytaire B par l'EBV : agrégation des cellules, induction de l'expression de marqueurs d'activation, de molécules d'adhésion et de molécules anti-apoptotiques. Parmi les protéines de latence de l'EBV, LMP1 est la seule à posséder des propriétés oncogéniques. L'expression de cette protéine dans des lignées fibroblastiques de rongeurs induit en effet toutes les modifications propres aux oncogènes telles que la perte du phénomène d'inhibition de contact, la croissance indépendante d'un ancrage et la tumorigénicité dans les souris nude (Wang, Cell 1985 ; Baichwal, Oncogene 1988). Par ailleurs, des souris transgéniques exprimant LMP1 sous la dépendance d'un promoteur B développent des lymphomes (Kulwichit, Proc Natl Acad Sci USA 1998). Par la création de virus EBV recombinants spécifiquement mutés pour LMP1, il a été montré que cette protéine, et en particulier sa portion C-terminale, joue un rôle indispensable dans la transformation cellulaire B par l'EBV (Kaye, Proc Natl Acad Sci USA 1993). Cette portion carboxy-terminale possède deux domaines, appelés CTAR1 (« C-terminal activating region 1 ») ou TES1 (« transformation effector site 1 ») et CTAR2 ou TES2, impliqués dans la fonction activatrice et transformante de LMP1. L'identification des protéines effectrices se liant à ces deux domaines a mis en évidence des homologies de fonction avec les TNFR, et montré que LMP1 se comporte comme un TNFR activé de façon constitutive. En effet, CTAR1/TES1 contient un site de fixation des TRAFs (« tumor necrosis factor receptor-associated factor »), molécules adaptatrices impliquées dans la transduction de signal par les TNFR (Mosialos, Cell 1995 ; Devergne, Mol Cell Biol 1996). Le deuxième domaine, CTAR2/TES2, lie directement

d'autres molécules également impliquées dans la transduction de signal par les TNFR, les molécules TRADD et RIP (Izumi, Proc Natl Acad Sci USA 1997 ; Izumi, Mol Cell Biol 1999). Via ces interactions, LMP1 active les voies NF- $\kappa$ B et c-jun N-terminal kinase (JNK)/AP1. L'activation de NF- $\kappa$ B est essentielle à la survie des lignées transformées par l'EBV (Cahir-McFarland, Proc Natl Acad Sci USA 2000). Une étude a suggéré que LMP1 activerait également la voie Jak-STAT par interaction avec Jak3 (Gires, EMBO J 1999). Toutefois, cette interaction n'a pas été observée par d'autres (Higuchi, J Virol 2002) et ne joue pas de rôle essentiel dans la transformation (Izumi, J Virol 1999).

### ➤ Mécanisme d'induction de l'expression d'*EBI3* par LMP1

Les TRAFs se lient au domaine CTAR1/TES1 de LMP1 via le motif consensus PXQXT/S (Devergne, Mol Cell Biol 1996). La signalisation induite par la fixation des TRAFs à ce domaine joue un rôle dans plusieurs des fonctions de LMP1 : dans la transformation (Izumi, Proc Natl Acad Sci USA 1997), dans l'induction de NF- $\kappa$ B (Devergne, Mol Cell Biol 1996), et dans l'induction de gènes cellulaires, parmi lesquels *EBI3* (Devergne, J Virol 1998). Ainsi, alors que l'expression stable ou transitoire de la protéine LMP1 sauvage dans des lignées Burkitt EBV induit l'expression d'*EBI3*, celle-ci n'est pas observée après expression d'un mutant de LMP1 contenant des mutations ponctuelles dans le motif PXQXT/S abolissant la fixation des TRAFs (Devergne, J Virol 1998). L'induction de l'expression d'*EBI3* par LMP1 est dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B. La co-expression dans la lignée B EBV BJAB de la protéine LMP1 sauvage et d'un mutant d' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  résistant à la dégradation,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  S32AS36A, empêchant la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau, inhibe de façon dose dépendante l'induction de l'expression d'*EBI3* par LMP1 (Devergne, J Virol 1998). De plus, le BAY11-7082, un inhibiteur chimique de la voie NF- $\kappa$ B qui empêche la phosphorylation de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , inhibe de façon rapide l'activation de NF- $\kappa$ B dans des lignées lymphoblastoïdes et diminue fortement l'expression de gènes cibles de NF- $\kappa$ B induits par LMP1, en particulier *EBI3* (Cahir-McFarland, J Virol 2004).

### ➤ **Lymphoproliférations et lymphomes associées à l'EBV**

Différentes pathologies lymphoïdes aux caractéristiques cliniques et histologiques différentes, peuvent être associées à l'EBV.

#### *Lymphoproliférations de l'immunodéprimé*

Les sujets présentant une diminution de leur immunité cellulaire T ont un haut risque de développer une lymphoprolifération. Les lymphoproliférations survenant dans la population des immunodéprimés sont le plus souvent B, et plus rarement T. Les plus étudiées sont les lymphoproliférations survenant après greffe d'organe, dénommées syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation. Leur incidence varie selon l'intensité de l'immunosuppression thérapeutique et donc de l'organe transplanté. Ainsi, elle est de 1 à 2% pour les greffes de rein ou de foie alors qu'elle est de 3 à 8% pour les greffes de cœur ou de poumon qui nécessitent une plus grande immunosuppression. L'incidence est plus grande quand le receveur est séronégatif pour l'EBV avant la greffe, ce qui explique que les enfants sont plus à risque que les adultes. Classiquement, les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation surviennent dans la première année suivant la greffe, quand l'immunodépression est la plus marquée. Presque tous sont associés à l'EBV. Ils expriment le plus souvent un profil de latence de type III (Young, N Eng J Med 1989) comme les lignées lymphoblastoïdes infectées *in vitro* par l'EBV, mais un profil d'expression plus restreint peut également être observé. De plus, dans une même tumeur, plusieurs profils d'expression des protéines de latence peuvent être observés (Brink, J Clin Pathol 1997). Ces lymphoproliférations sont classées en trois stades : des lésions précoces ressemblant à une mononucléose infectieuse, des lésions polymorphes et enfin des lésions monomorphes décrites comme des lymphomes de type immunoblastique. Chez un même patient, les aspects observés peuvent être hétérogènes et ne sont pas corrélés au caractère monoclonal ou polyclonal de la prolifération.



Les lymphomes survenant après la première année de greffe représentent un groupe de tumeurs plus hétérogène avec une association à l'EBV dans moins de 50% des cas seulement et une fréquente monoclonalité de la prolifération.

Chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) fortement immunodéprimés, les lymphomes du système nerveux central ont un phénotype similaire aux syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation.

### *Lymphomes de Hodgkin*

Les lymphomes de Hodgkin sont caractérisés par la présence de cellules tumorales présentant une morphologie particulière appelées cellules de Hodgkin et cellules de Reed-Sternberg (HRS). Ce sont des cellules très volumineuses, au noyau ovale (cellules de Hodgkin) ou polylobé (cellules de Reed-Sternberg), et au nucléole de très grande taille. Ces cellules tumorales représentent moins de 1% de la population cellulaire totale qui comprend selon les types et sous-types histologiques, une proportion variable de macrophages, de plasmocytes, de polynucléaires éosinophiles et de mastocytes, attirés sur place par des facteurs chimio-attractants produits par les cellules tumorales. Les lymphomes de Hodgkin regroupent deux entités cliniques et biologiques: la forme dite « classique », elle-même subdivisée en trois sous-types, « sclérosant nodulaire », « cellularité mixte » et « déplétion lymphoïde », et la forme « nodulaire à prédominance lymphocytaire ». La forme « nodulaire à prédominance lymphocytaire » est très rarement associée à l'EBV, alors que celui-ci est détecté dans les cellules tumorales dans environ 40% des lymphomes de Hodgkin classiques : dans la plupart des sous-types « cellularité mixte » et « déplétion lymphoïde » et dans une minorité des cas de type « sclérosant nodulaire ». Dans les lymphomes de Hodgkin associés à l'EBV, le virus est présent dans toutes les cellules tumorales. Celles-ci expriment un profil de latence de type II, caractérisé par l'expression d'EBNA1, de LMP1 et de LMP2 (Deacon, J Exp Med 1993).

Dans les lignées dérivées de lymphomes de Hodgkin, il existe un haut niveau d'activation constitutive de NF- $\kappa$ B et de ses gènes cibles (Bargou, Blood 1996 ; Hinz, Blood 2001 ; Hinz, J Exp Med 2002). Cette activation constitutive est nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules (Bargou, J Clin Invest 1997). Plus récemment, cette activation de NF- $\kappa$ B a été

mise en évidence dans les lymphomes de Hodgkin *in situ* (Garcia, Blood 2003). Ce haut niveau d'activation de NF- $\kappa$ B peut être partiellement expliqué par l'expression de LMP1 dans les cellules tumorales. Cependant, une activation de NF- $\kappa$ B est également observée dans les cellules tumorales des lymphomes de Hodgkin non associés à l'EBV. Dans ces lymphomes, l'activation de NF- $\kappa$ B peut résulter d'autres mécanismes, tels que la présence de mutations somatiques délétères dans l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  (Wood, Oncogene 1998 ; Cabannes, Oncogene 1999 ; Jungnickel, J Exp Med 2000), l'amplification du gène *c-rel* (Joos, Blood 2002 ; Martin-Subero, Blood 2002 ; Barth, Blood 2003), ou encore l'expression et l'activation constitutive de la molécule CD30 (Horie, Oncogene 2002 ; Horie, Am J Pathol 2002).

### *Lymphomes de Burkitt*

On distingue trois formes de lymphome de Burkitt. Le type dit « endémique » a été le premier décrit en Afrique centrale avec une incidence très élevée et une distribution géographique semblant liée à des conditions climatiques particulières et coïncidant avec les zones d'endémie du paludisme lié à *Plasmodium falciparum*. Ce lymphome se présente comme une masse extra-ganglionnaire, le plus souvent de localisation céphalique ou intra-abdominale. Histologiquement, il s'agit d'une prolifération monomorphe de cellules B de taille moyenne possédant un index de prolifération très élevé (plus de 99% de cellules tumorales marquées par l'anticorps anti-Ki-67, marqueur de prolifération) et un haut niveau d'apoptose comme en témoigne la présence de nombreux macrophages dispersés entre les cellules tumorales et résorbant des débris apoptotiques. Le lymphome endémique est associé à l'EBV dans quasiment tous les cas.

Des lymphomes de Burkitt peuvent être observés partout dans le monde en dehors des territoires du Burkitt endémique. Ils ont les mêmes caractéristiques histologiques et cytogénétiques et sont appelés sporadiques. Leur incidence est beaucoup plus rare, de 50 à 100 fois inférieure aux Etats-Unis ou en Europe de l'Ouest par rapport aux lymphomes de Burkitt endémiques en Afrique centrale. Ils surviennent chez des enfants plus âgés et se présentent plus souvent sous la forme d'une masse abdominale ou d'une leucémie. Il ne sont

associés à l'EBV que dans 15% des cas aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest, mais dans jusqu'à 50 à 80% des cas en Amérique du Sud ou en Afrique du Nord.

Le troisième type de lymphome de Burkitt est celui qui survient chez les sujets infectés par le VIH. La présentation clinique ressemble à celle du Burkitt sporadique. Il est associé à l'EBV dans 25 à 40% des cas.

Dans les lymphomes de Burkitt associés à l'EBV, le profil de latence est de type I avec une expression des protéines virales de latence limitée à celle d'EBNA1 (Rowe, EMBO J 1987 ; Kelly, Nat Med 2002). Le rôle de l'EBV dans la genèse de ces lymphomes reste flou. Les lymphomes de Burkitt sont caractérisés par une translocation qui place le proto-oncogène *myc* sous la dépendance du promoteur du gène de la chaîne lourde ou légère des Igs et induit son expression aberrante. Cette translocation est présente quel que soit le statut EBV.

#### *Granulomatose lymphomatoïde*

La granulomatose lymphomatoïde, auparavant confondue avec le lymphome T/NK extra-ganglionnaire, est une affection rare, touchant l'adulte, plus fréquente en cas de déficit immunitaire soit acquis (greffe, infection par le VIH), soit d'origine génétique (syndrome de Wiskott-Aldrich, syndrome lymphoprolifératif lié à l'X). Les localisations les plus fréquentes sont le poumon, la peau, le rein, le foie et le cerveau. Il s'agit d'un syndrome lymphoprolifératif B associé à l'EBV, caractérisé histologiquement par un infiltrat cellulaire polymorphe composé de quelques grandes cellules B atypiques tumorales le plus souvent EBV<sup>+</sup> et de très nombreux lymphocytes T non tumoraux, ainsi que par des signes d'angiocentrisme et d'angiodestruction marqués. La prolifération est souvent monoclonale. La protéine LMP1 est le plus souvent détectée dans les cellules B tumorales (Myers, Am J Surg Pathol 1995 ; Haque, Mod Pathol 1998). L'expression des autres protéines de latence a été peu étudiée.

### *Lymphomes T/NK*

Plus rarement, on observe des lymphomes T associés à l'EBV. Le lymphome T/NK extra-ganglionnaire, nasal ou de type nasal, survient plus fréquemment en Asie, au Mexique, en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Il affecte les adultes. Quelques cas ont été décrits chez des sujets immunodéprimés, après transplantation ou non. Dans la plupart des cas, les cellules tumorales sont de phénotype NK ; dans quelques cas, elles sont de phénotype T. Dans quasiment tous les cas, les cellules tumorales expriment les protéines associées aux granules cytotoxiques TiA1, granzyme B et perforine. Histologiquement, il s'agit d'un lymphome de haut grade caractérisé par un infiltrat cellulaire diffus de morphologie variée, associé à des images d'angiocentrisme ou d'angiodestruction. L'EBV est détecté dans la grande majorité des cas, avec un profil de latence de type II (Kanavaros, Blood 1993 ; Harabuchi, Cancer 1996, Chiang, Int J Cancer 1996).

En dehors de ces lymphoproliférations classiquement associées à l'EBV, la présence de l'EBV peut être mise en évidence dans d'autres types de lymphomes. Ainsi, dans les lymphomes T de type lymphadénite angio-immunoblastique, l'EBV est détecté dans de rares cellules d'aspect blastique, le plus souvent de phénotype B. Toutefois, ces cellules sont de nature non tumorale, et dans ces cas, l'EBV est davantage considéré comme un « passager » que comme un agent causal de la pathologie.

#### ➤ **Réponse immune au cours des lymphoproliférations associées à l'EBV**

Les cytokines peuvent participer à la pathogenèse tumorale de différentes manières. Elles peuvent jouer un rôle de facteur de croissance autocrine ou paracrine pour les cellules tumorales. Elles peuvent faciliter l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire par inhibition de la fonction de présentation d'Ag ou de la réponse T anti-tumorale. Elles ont également des effets sur le microenvironnement tumoral en agissant sur la néoangiogénèse tumorale et l'attraction de cellules inflammatoires et immunes (chimiokines). L'expression et le rôle des cytokines ont été le plus étudiés dans les lymphomes de Hodgkin et dans les lymphoproliférations de l'immunodéprimé.

Dans les lymphomes de Hodgkin classiques, les études ont été réalisées à la fois *in vitro* à l'aide de lignées dérivées de lymphomes de Hodgkin, et *in situ* dans les tissus tumoraux. L'inconvénient de l'utilisation des lignées dérivées de lymphome de Hodgkin est qu'elles ne sont probablement pas représentatives de tout le spectre de la maladie, mais plutôt des formes avancées. Ces études ont montré le rôle clé de l'IL-13 comme facteur autocrine de croissance des cellules tumorales. L'IL-13 et son récepteur sont en effet exprimés dans la plupart des cas, par les lignées (Kapp, J Exp Med 1999 ; Oshima, Cell Immunol 2001) et par les cellules tumorales primaires (Skinnider, Blood 2002 ; Ohshima, Histopathology 2001). Dans plusieurs lignées, la prolifération est inhibée par des anticorps neutralisants anti-IL-13 (Oshima, Cell Immunol 2001). L'IL-9 pourrait également jouer un rôle de facteur autocrine de croissance (Merz, Blood 1991 ; Carbone, Blood 1995), ce qui n'a pas été démontré pour l'IL-6 malgré son expression fréquente par les cellules tumorales ainsi que celle de son récepteur (Jucker, Blood 1991 ; Hsu, Am J Pathol 1992). D'autres cytokines sont détectées *in situ* dans une fraction plus ou moins importante des cellules tumorales et en abondance variable selon le type histologique, comme l'IL-1, l'IL-2, l'IL-5, l'IL-10, le TGF- $\beta$  et l'IFN- $\gamma$ . Certaines chimiokines sont aussi exprimées à de plus hauts niveaux dans les tissus de lymphome de Hodgkin par rapport à des tissus lymphoïdes normaux : il s'agit des chimiokines Th1 IP-10, MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES, avec une expression plus forte des trois premières dans les formes de type « cellularité mixte » et dans les formes associées à l'EBV (Teruya-Feldstein, Blood 1999). Au contraire, dans les formes de type « nodulaire sclérosant », une augmentation plus fréquente des chimiokines Th2, TARC, éotaxine et MDC est observée. Ces chimiokines pourraient être responsables de l'afflux des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la tumeur. L'IL-5 et l'éotaxine joueraient aussi un rôle important dans l'éosinophilie constatée dans les tissus de lymphomes de Hodgkin. La fibrose dans les sous-types « nodulaire sclérosant » a été attribuée à la production de TGF- $\beta$  par les cellules tumorales et les éosinophiles (Newcom, J Clin Invest 1988).

Dans les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation, il a été mis en évidence une expression différentielle des messagers de l'IL-18, de l'IFN- $\gamma$ , de MIG et de RANTES : leur expression est localement diminuée dans les tumeurs en comparaison avec les organes

lymphoïdes des patients ayant une mononucléose infectieuse aiguë (Setsuda, Am J Pathol 1999). L'IL-18 est une cytokine qui induit l'expression d'IFN- $\gamma$ , de MIG et de RANTES, or chez la Souris, il a été montré que l'IL-18 et MIG possèdent une activité anti-tumorale par inhibition de l'angiogénèse, ce qui suggère un rôle de ces médiateurs dans la pathogénie de ces lymphoproliférations. MIG et la chimiokine IP-10 ont également été impliquées dans les phénomènes d'angiodestruction observés dans les granulomatoses lymphomatoïdes et dans les lymphomes T/NK de type nasal (Teruya-Feldstein, Blood 1997). Dans des cas de lymphome NK nasal, il a été mis en évidence la présence du messager de l'IL-10 dans les cellules tumorales, dans des territoires riches en cellules LMP-1<sup>+</sup> (Boulland, Am J Pathol 1998). Celle-ci pourrait constituer un facteur autocrine de croissance.

En ce qui concerne l'expression de l'IL-27 dans les lymphoproliférations associées à l'EBV, des travaux antérieurs du groupe réalisés en collaboration avec G. Niedobitek (Université d'Erlangen, Allemagne) avaient montré l'expression forte de la protéine EB13 *in vitro* dans des lignées dérivées de maladie de Hodgkin, et *in situ* dans les cellules tumorales dans 32 cas sur 33 de lymphomes de Hodgkin (plus de 90% des cellules tumorales positives pour EB13 dans 3/4 des cas), indépendamment du sous-type et du statut EBV (Niedobitek, J Pathol 2002). En revanche, l'expression d'EB13 n'avait pas été détectée dans les 6 cas étudiés de lymphome de Burkitt endémique EBV<sup>+</sup>. Cette étude montrait aussi qu'une faible proportion de cas de carcinome indifférencié du naso-pharynx EBV<sup>+</sup> exprimait EB13 (6 sur 34 analysés), le plus souvent focalement. Aucune étude de l'expression de p28 dans les lymphomes liés à l'EBV n'avait été réalisée.

### **3.2. L'HTLV-1**

En dehors de l'EBV, un autre virus est associé chez l'Homme au développement de lymphomes, le rétrovirus HTLV-1 (Human T-cell leukemia virus). Ce rétrovirus infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Richardson, J Virol 1990) et à un moindre degré les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, qui peuvent constituer un réservoir viral (Nagai, Blood 2001). Il est associé à une forme particulière de lymphoprolifération maligne : la leucémie/lymphome T de

l'adulte (ATL), qui s'observe essentiellement au Japon et dans les Caraïbes. L'ATL correspond à une prolifération de lymphocytes T matures, le plus souvent CD4<sup>+</sup>, plus rarement CD8<sup>+</sup>. C'est une maladie systémique impliquant, en dehors des ganglions lymphatiques et du sang, la peau, la rate, le foie, les poumons et le tube digestif. L'HTLV-1 est également associé à une autre maladie chez l'Homme : la myélopathie associée à l'HTLV-1 (HAM), ou paraparésie spastique tropicale (Osame, Lancet 1986), une affection neurologique caractérisée par une démyélinisation progressive de la moelle épinière.

L'ATL se développe chez 2 à 5% des sujets infectés par l'HTLV-1 après une longue période de latence, suggérant un processus d'immortalisation et de transformation des lymphocytes T en plusieurs étapes. Quatre formes cliniques d'ATL sont décrites: la forme aiguë leucémique, la forme lymphome, la forme chronique et la forme « smoldering » (Shimoyama, Br J Haematol 1991). Les formes leucémie et lymphome sont les formes cliniques les plus évoluées de la maladie, de très mauvais pronostic avec environ 90% de décès à 3 ans. La forme aiguë est caractérisée par une phase leucémique avec une élévation du nombre de leucocytes dans le sang, une éruption cutanée et des lymphadénopathies généralisées. Une hypercalcémie est fréquente ainsi qu'une baisse de l'immunité cellulaire favorisant les infections opportunistes et le décès du patient. Le variant lymphomateux est caractérisé par des lymphadénopathies sans atteinte sanguine. L'hypercalcémie est plus rare. Les formes chronique et « smoldering » sont moins agressives.

### ➤ **Mécanismes de transformation lymphocytaire T par l'HTLV-1 ; Rôle de la protéine virale Tax**

Dans les cellules tumorales, le virus HTLV-1 est intégré de façon monoclonale. Le génome viral possède des séquences gag, pol, env et LTR. Une région située entre env et LTR appelée pX comporte des gènes codant pour des protéines virales régulatrices dont la protéine oncogénique Tax.

A l'instar de la protéine LMP1 de l'EBV, la protéine Tax joue un rôle clé dans la transformation par l'HTLV-1. Tax est une protéine de 40 kDa qui transactive la transcription

des gènes viraux par interaction avec des membres de la famille CREB/ATF (Zhao, Proc Natl Acad Sci USA 1992 ; Suzuki, Proc Natl Acad Sci USA 1993 ; Adya, J Virol 1995 ; Yin, J Virol 1995 ; Reddy, Oncogene 1997 ; Gachon, J Virol 1998). Tax induit aussi l'expression de nombreux gènes cellulaires en activant différentes voies de signalisation comme le SRF, AP-1 ou NF- $\kappa$ B dont des gènes cibles codent des cytokines, des récepteurs de cytokines et des proto-oncogènes (Yoshida, Curr Top Microbiol Immunol 1995). Comme LMP1, Tax se comporte comme un oncogène. Tax, dans le contexte d'un vecteur virus herpès saimiri, est nécessaire et suffisante pour immortaliser des lymphocytes T primaires (Grassmann, Proc Natl Acad Sci USA 1989 ; Grassmann, J Virol 1992). L'expression de Tax dans des lignées de fibroblastes de rongeurs induit les modifications phénotypiques propres aux oncogènes, dont la tumorigénicité dans les souris nude (Tanaka, Proc Natl Acad Sci USA 1990). Des souris transgéniques exprimant Tax sous la dépendance du promoteur du *granzyme B* développent des leucémies (Grossman, Proc Natl Acad Sci USA 1995), et des souris transgéniques exprimant Tax sous le contrôle des séquences LTR d'HTLV-1 développent des tumeurs mésoenchymateuses (Nerenberg, Science 1987). Dans les cellules transformées par l'HTLV-1, l'action oncogénique de Tax aboutit à la dérégulation du cycle cellulaire normal et des mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN (Marriott, J Biomed Sci 2002).

Si les propriétés de Tax *in vitro* sont bien établies, son rôle *in vivo* demeure moins bien connu. En effet, l'expression de Tax *in situ* dans les tissus d'ATL est difficile à mettre en évidence, et la plupart des cellules leucémiques des ATL aigus n'expriment pas Tax à un niveau détectable (Kinoshita, Proc Natl Acad Sci USA 1989). Plus précisément, il a été observé que dans la moitié des ATL, les cellules leucémiques ne peuvent pas exprimer Tax en raison de délétions dans la région 5'-LTR du virus (Tamiya, Blood 1996). Or, ce type de virus déficient est significativement associé aux formes aiguës et lymphome de l'ATL (Tamiya, Blood 1996). Toutefois, en dépit de cette absence d'expression détectable de Tax, il existe dans les cellules leucémiques une activation constitutive des voies NF- $\kappa$ B et JNK/ AP-1 (Xu, Oncogene 1996 ; Mori, Blood 1999). Ces résultats suggèrent que la protéine Tax pourrait être impliquée dans les stades précoces de la leucémogénèse et que d'autres mécanismes mis en place ultérieurement pourraient relayer l'effet de Tax en se substituant à ses fonctions.



### ➤ Réponse immune au cours de l'infection par l'HTLV-1

Les cellules infectées par l'HTLV-1 produisent, de façon dépendante ou non de Tax, différentes cytokines jouant un rôle de facteur autocrine de croissance, ou inhibant la réponse anti-virale et anti-tumorale. Ainsi, dans les cellules infectées par l'HTLV-1, Tax active la transcription des gènes de l'IL-2 et de son récepteur, ce qui permet à l'IL-2 d'agir comme un facteur de croissance autocrine, notamment au début de l'infection par l'HTLV-1 quand la croissance des cellules infectées est dépendante de l'IL-2 (Ballard, Science 1988 ; Wano, Proc Natl Acad Sci USA 1988 ; Yssel, J Immunol 1989). Tax induit également la production d'un puissant immunosuppresseur, le TGF- $\beta$  (Niitsu, Blood 1988). Les cellules d'ATL produisent d'autres cytokines telles que l'IL-1 (Wano, J Clin Invest 1987), l'IL-6 (Villiger, J Immunol 1991), l'IL-5, le M-CSF et le GM-CSF (Wano, Proc Natl Acad Sci USA 1988). Plus récemment, un rôle autocrine de l'IL-13 et de la chimiokine anti-apoptotique I-309 dans la croissance des cellules infectées par l'HTLV-1 a été proposé (Ruckes, Blood 2001 ; Waldele, J Virol 2004).

Quand nous avons débuté nos travaux, aucune étude de l'expression de l'IL-27 dans les ATL n'avait été publiée.

## 4. DIFFERENCIATION B ET LYMPHOMAGENESE B NON VIRO-INDUITE

### 4.1. DIFFERENCIATION B NORMALE

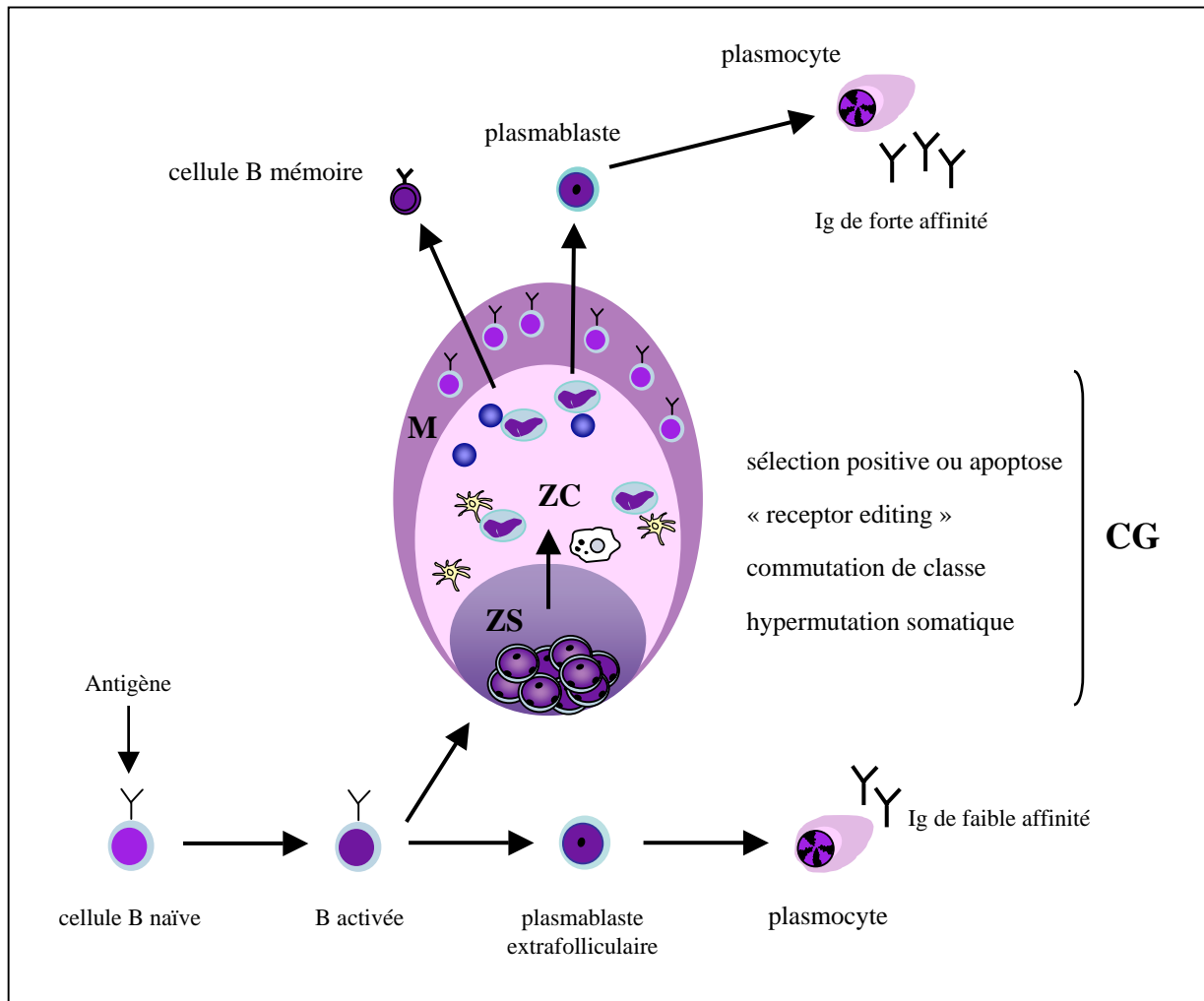
Les phases précoces du développement B ont lieu dans la moelle osseuse. Dans ce compartiment, les gènes codant les portions variables des chaînes lourdes et légères des Igs sont soumis, via l'action des recombinases RAG1 et RAG2, au processus de recombinaison V(D)J aboutissant à la formation d'un récepteur B (BCR) de spécificité donnée, constitué de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques. La cellule B naïve possédant à sa surface un BCR fonctionnel et non autoréactif sort de la moelle osseuse et gagne les organes lymphoïdes secondaires. Après activation par un antigène spécifique, la







cellule B naïve peut s'engager dans deux voies différentes. Elle peut se différencier dans les territoires extra-folliculaires en plasmablaste à demi-vie courte, à l'origine de plasmocytes producteurs d'anticorps de faible affinité pour l'antigène. Alternativement, elle peut entrer dans un follicule lymphoïde primaire et être à l'origine de la structure spécialisée qu'est le centre germinatif (CG) du follicule lymphoïde secondaire, dans lequel se déroule le processus menant à la génération de plasmocytes producteurs d'anticorps de haute affinité pour l'antigène et de cellules B « mémoire » (Figure 5) (MacLennan, revue in Annu Rev Immunol, 1994 ; MacHeyzer-Williams, revue in Curr Opin Hematol 2001).

➤ **Formation de la zone sombre du centre germinatif ; hypermutation somatique**

Schématiquement, en moyenne 3 cellules B activées par l'antigène colonisent un follicule lymphoïde primaire où elles subissent une première phase d'expansion clonale rapide au sein d'un stroma constitué de cellules folliculaires dendritiques. A l'issue de cette phase d'expansion clonale, dont les mécanismes d'induction et de régulation sont mal connus, les cellules B forment la zone sombre du CG. Ces cellules B, appelées centroblastes à ce stade de différenciation, ont réprimé l'expression de nombreux marqueurs, dont les Igs des surface, IgD et IgM (Tableau 1). Les centroblastes sont les cellules de l'organisme qui se divisent le plus rapidement, avec un temps de doublement de 7 heures seulement. Morphologiquement, ce sont des cellules de grande taille, au noyau ovale volumineux et au cytoplasme réduit.

Dans la zone sombre du CG, les cellules B sont soumises au processus d'hypermutation somatique. Ce processus induit des mutations dans les gènes codant les parties variable des chaînes lourdes et légères des Igs ainsi que dans d'autres gènes tels que *BCL-6*, *Fas*, *B29* et *mb1*. Il s'agit le plus souvent de substitutions nucléotidiques, occasionnellement de délétions ou de duplications. Ce processus d'hypermutation somatique génère divers mutants des clones des cellules B à l'origine du CG.



- |   |                 |   |                                  |
|---|-----------------|---|----------------------------------|
|  | cellule B naïve |  | macrophage à corps tingibles     |
|  | centroblaste    |  | cellule folliculaire dendritique |
|  | centrocyte      |  | lymphocyte T CD4+                |

**Figure 5 : Représentation schématique de la différenciation B normale**

CG : centre germinatif, ZS : zone sombre, ZC : zone claire, M: manteau

### ➤ Formation de la zone claire du CG ; sélection antigénique

Les centroblastes donnent naissance à des cellules qui ne prolifèrent pas, réexpriment à un niveau faible le BCR à leur surface et quittent la zone sombre du CG pour gagner la zone claire, riche en cellules folliculaires dendritiques et en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces cellules, dont la morphologie et le phénotype diffèrent de celui des centroblastes, sont appelées centrocytes. Ce sont des cellules au noyau clivé de taille petite ou moyenne et peu nucléolé.

Les centrocytes sont voués à la mort par apoptose s'ils ne sont pas sauvés par des signaux de survie fournis par les cellules du stroma. Ce processus de sélection se déroule en deux étapes, et met en jeu deux types cellulaires, les cellules folliculaires dendritiques et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Dans un premier temps, le centrocyte capable de reconnaître avec une forte affinité l'antigène présenté dans des complexes immuns à la surface de la cellule folliculaire dendritique, reçoit un premier signal de survie. Dans un deuxième temps, le centrocyte présente les peptides antigéniques à un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> de même spécificité, dans lequel il induit l'expression du ligand de CD40, CD40L. Cette interaction T/B antigène spécifique impliquant le couple CD40/CD40L fait suite à une première interaction de même type entre le lymphocyte T activé et le lymphocyte B lors de l'initiation de la formation du follicule lymphoïde secondaire. Dans la zone claire du CG, l'interaction CD40/CD40L active dans la cellule B le facteur de transcription NF-κB et induit l'expression de ses gènes cibles. On observe l'induction de l'expression de molécules antiapoptotiques, telles que BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub>, et la modulation de l'expression à la surface de la cellule de molécules d'adhésion et de stimulation. Le centrocyte activé prolifère, puis s'engage soit dans la voie de différenciation plasmocytaire, soit dans la différenciation en cellule B « mémoire ».

La plupart des centrocytes n'exprime pas un BCR de haute affinité et meurt par apoptose ; leur débris sont phagocytés par des macrophages spécialisés du CG, les macrophages à corps tingibles. Les centrocytes exprimant un BCR d'affinité moyenne peuvent être soumis au processus de « receptor editing », au cours duquel sont réexprimées les recombinases RAG1 et RAG2 impliquées dans la recombinaison V(D)J, et qui peut

**Tableau 1 : Phénotype des différentes sous-populations B**

	IgM*	IgD*	CD10	CD38	CD138	BCL-2	BCL-6	Ki-67	MUM1
cellule B naïve	+	+	-	-	-	+	-	-	-
centroblaste	-	-	+	+	-	-	+	+	-
centrocyte	<b>“low”</b>	-	+	+	-	-	+	-	-
plasmablaste	-	-	-	+	-	+	-	+	+
plasmocyte	-	-	-	-	+	+	-	-	+
cellule B « mémoire »	<b>+/-</b>	-	-	-	-	+	-	-	-

\* Ig de surface

aboutir à la formation d'un BCR de haute affinité. Au total, plus de 95% des cellules B produites dans le CG subiraient la mort par apoptose.

Il est communément admis que la plupart des centrocytes ne prolifèrent pas dans la zone claire (Hanna, Lab Invest 1964). Cependant une modélisation informatique récente du développement du CG indique une forte probabilité pour qu'une fraction des centrocytes se ré-engagent dans le cycle cellulaire tout en restant dans la zone claire (Meyer-Hermann, J Immunol 2005) et non en retournant dans la zone sombre comme d'autres modèles plus anciens l'avaient proposé (Kepler, Immunol Today 1993 ; Kelsoe, Semin Immunol 1996).

### ➤ **Commutation isotypique**

Le stade de différenciation auquel la commutation de classe isotypique se produit est mal connu. La plupart des centroblastes issus d'amygdale chez l'Homme ont déjà délété le gène codant la chaîne  $\mu$  des Igs, ce qui suggère que la commutation de classe se produirait avant la sélection (Feuillard, Int Immunol 1995). Une même enzyme, la protéine AID (activation-induced cytidine deaminase), est essentielle à la fois au processus d'hypermutation somatique et à la commutation de classe isotypique. En son absence, dans des souris « knock-out » pour *AID* et dans la forme autosomique récessive du syndrome hyper-IgM chez l'Homme, il existe une absence de commutation de classe, un défaut d'hypermutation somatique et des CGs anormaux (Revy, Cell 2000 ; Muramatsu, Cell 2000).

L'interaction T/B joue également un rôle dans ce processus, notamment par l'interaction CD40/CD40L. Des patients porteurs de mutations de CD40L développent en effet un syndrome hyper-IgM (syndrome hyper-IgM lié à l'X), avec un défaut de commutation de classe et un défaut de réponse humorale T dépendante (Aruffo, Cell 1993 ; Allen, Science 1993 ; DiSanto, Nature 1993). L'interaction T/B peut également agir par l'intermédiaire des cytokines produites localement par les lymphocytes T, en dirigeant la commutation de classe vers un isotype spécifique : chez la Souris, l'IL-4 favorise la production d'IgE et d'IgG4, le TGF- $\beta$  celle d'IgA et d'IgG2b, l'IFN- $\gamma$  celle d'IgG2a et d'IgG3. Récemment, il a été montré que le facteur de transcription T-bet joue un rôle

important dans la commutation de classe vers l'isotype IgG2a (Peng, Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; Gerth, Int Immunol 2003).

La commutation de classe dépend également étroitement de l'organe lymphoïde secondaire où a lieu la réponse du CG. Dans les ganglions lymphatiques périphériques, la rate et les amygdales, les Igs produites sont principalement de type IgG avec une minorité d'Ig de type IgA et encore moins d'IgM. En revanche, dans les plaques de Peyer du tube digestif et les ganglions lymphatiques mésentériques, les plasmocytes ne produisent que des IgA (revue in Fagarasan, Curr Opin Immunol 2004).

### ➤ **Transition cellule B du CG/plasmocyte**

Le centrocyte engagé dans la différenciation plasmocytaire donne naissance à un plasmablaste, cellule en prolifération de morphologie différente d'un centrocyte et d'aspect blastique, puis à un plasmocyte producteur d'anticorps de haute affinité. La transition cellule B du CG/plasmocyte est régulée par des gènes importants comme *BCL-6* et *BLIMP1*. Ces deux gènes sont impliqués dans une boucle de rétrocontrôle négatif. *BCL-6* est un facteur de transcription qui réprime l'expression de nombreux gènes dont des gènes impliqués dans la différenciation B terminale. Une des cibles de *BCL-6* est le gène *BLIMP1*. *BLIMP1* est un répresseur transcriptionnel qui bloque certaines fonctions du lymphocyte B mature comme la transduction du signal par le BCR, les processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique. Au cours de la différenciation plasmocytaire, *BLIMP1* réprime *BCL-6* en retour. Dans le CG, la plupart des cellules B sont *BCL6*<sup>+</sup> *BLIMP1*<sup>-</sup>, mais une minorité sont *BCL-6*<sup>-</sup> *BLIMP1*<sup>+</sup>. Les cellules *BCL-6*<sup>-</sup> du CG expriment également la protéine *MUM1/IRF4*. Les cellules *BCL6*<sup>-</sup> *BLIMP1*<sup>+</sup> *MUM1*<sup>+</sup> correspondent probablement à des cellules B engagées dans la voie de différenciation plasmocytaire avant leur sortie du CG, certaines au stade de plasmablaste. Dans les follicules lymphoïdes, ces cellules, peu nombreuses, sont situées dans la zone claire du CG. Elles sont parfois observées dans la zone du manteau où elles pourraient correspondre à des plasmablastes en train de quitter le follicule

lymphoïde et transitant à travers la zone du manteau. Les plasmablastes quitteraient le CG alors qu'ils seraient toujours engagés dans le cycle cellulaire.

Des cellules B MUM1<sup>+</sup> d'aspect blastique sont également observées en dehors du CG, en particulier dans les zones T. Elles peuvent correspondre à des plasmablastes issus de la voie de différenciation B extra-folliculaire avant leur différenciation en plasmocytes producteurs d'anticorps de faible affinité.

La plupart des études de la réponse du CG ont été réalisées chez la Souris. Cependant, il existe des différences marquées entre les CGs humains et murins, rendant délicate la transposition de certains résultats obtenus chez la Souris à l'Homme.

## **4. 2. LYMPHOMAGENESE B**

Les lymphomes sont des proliférations lymphoïdes malignes clonales dont l'incidence, en augmentation constante, est de 20 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants dans les pays occidentaux (Fisher, Oncogene 2004). 95% des lymphomes sont d'origine B. Les caractéristiques principales des lymphomes B matures les plus fréquents sont résumées dans le tableau 2.

### **➤ Evènements transformants**

De nombreux lymphomes B sont caractérisés par la présence d'une translocation, souvent réciproque équilibrée, impliquant un locus des gènes des Igs et un proto-oncogène.

Au cours de la différenciation B normale, les processus de réarrangement V(D)J, d'hypermutation somatique, et de commutation de classe isotypique, entraînent des modifications des gènes des Igs. Ces étapes, qui comportent des cassures d'ADN, prédisposent à des translocations chromosomiques. Le plus souvent, la translocation dérégule un proto-oncogène, le plaçant sous la dépendance d'un locus actif, le plus souvent d'un gène des Igs. L'étude des points de cassure des gènes des Igs montre trois types de cassure chromosomiques indiquant la survenue des translocations au cours : 1) du réarrangement V(D)J dans la moelle osseuse, 2) du processus d'hypermutation somatique, ou 3) de la



**Tableau 2 : Caractéristiques principales des lymphomes B matures**

Type	Evolution	Fréquence*	Anomalies génétiques principales
<b>Lymphome du manteau</b>	Incurable Survie médiane 3 à 5 ans	6%	<i>Cycline D1-IgH</i> Mutation <i>ATM</i> Délétion 13q14
<b>Lymphome folliculaire</b>	Incurable Survie 73% à 10 ans	20%	<i>BCL-2-IgH</i>
<b>Lymphome de Burkitt</b>	Agressif Curable dans plus de 80% des cas	2%	<i>c-Myc -IgH</i> ou <i>-IgL</i> Mutations <i>p53, Rb</i>
<b>Lymphome de Hodgkin</b>	Agressif Curable dans plus de 80% des cas	10%	Amplification <i>REL</i> Mutations <i>IkBa, CD95</i>
<b>Lymphome B diffus à grandes cellules</b>	Agressif Curable dans 40% des cas	30 à 40%	Réarrangements <i>BCL-6</i> <i>BCL-2-IgH, c-Myc -IgH</i> ou <i>-IgL</i> Mutations <i>CD95, ATM, p53</i>
<b>LLC/lymphome lymphocytaire</b>	Muté : agressif Non-muté : indolent	7%	Mutations <i>ATM, p53</i> Délétion 13q14
<b>Lymphomes de la zone marginale splénique</b>	Indolents	3%	Delétion 7q22-36
<b>Lymphomes du MALT</b>	Indolents	7%	<i>API2-MALT1, BCL-10-IgH, MALT1-IgH, FOXP1-IgH</i> Mutation <i>CD95</i>
<b>Lymphome lymphoplasmocytaire</b>	Incurable Survie médiane : 5 ans	1%	<i>PAX5-IgH</i>
<b>Myélome</b>	Incurable Survie médiane : 3 ans	10%	<i>cyclin D1-IgH, c-MAF-IgH, FGFR3-IgH</i> Altérations de <i>CD95, c-Myc, Ras</i> Délétion 13p14

\* : fréquence de chaque sous-type parmi l'ensemble des lymphomes B et T en Europe et en Amérique du Nord.

commutation de classe isotypique. Le fait que les deux derniers mécanismes surviennent dans le CG pourrait expliquer que la plupart des lymphomes B ont pour origine une cellule de CG ou une cellule ayant transité par celui-ci (cellule post-CG). En plus des translocations chromosomiques impliquant les gènes des Igs, on observe également d'autres événements potentiellement transformants comme des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs (*p53*, *IκBα*), des amplifications génomiques (*REL*) et des translocations impliquant d'autres loci que ceux des Igs (*API2-MALT1*) (revue in Kuppers, Nat Rev Cancer 2005). Par exemple, les translocations t(14;18) du lymphome folliculaire et t(11;14) du lymphome du manteau proviennent d'anomalies survenues au cours de la recombinaison V(D)J (Welzel, Cancer Res 2001 ; Kuppers, Nat Rev Cancer 2005). Elles mettent respectivement les gènes *BCL2* et *cycline D1* sous la dépendance du locus de la chaîne lourde des gènes des Igs (IgH), ce qui induit leur surexpression. En revanche, l'étude de la translocation t(8;14) impliquant *c-myc* et le locus IgH du lymphome de Burkitt endémique montre que la translocation surviendrait plutôt au cours de l'hypermutation somatique (Pelicci, Proc Natl Acad Sci USA 1986 ; Goossens, Proc Natl Acad Sci USA 1998). Des translocations survenant au cours de la commutation de classe isotypique seraient impliquées, quant à elles, dans le développement des lymphomes de Burkitt sporadiques et des myélomes (Neri, Proc Natl Acad Sci USA 1988 ; Bergsagel, Proc Natl Acad Sci USA 1996).

Le processus d'hypermutation somatique est fréquemment altéré dans les lymphomes B et il est à l'origine de multiples mutations introduites dans des territoires physiologiquement non impliqués dans ce processus, avec des gènes cibles aberrants comme les proto-oncogènes *PIMI*, *PAX5* et *c-MYC*. Ces anomalies surviendraient dans 50% des lymphomes B diffus à grandes cellules (Pasqualucci, Nature 2001).

Bien que l'évènement transformant puisse survenir à des stades précoces du développement B, la cellule B transformée peut, dans un certain nombre de cas, continuer le processus de différenciation et s'arrêter à un stade de différenciation ultérieur par rapport au stade où s'est produite l'anomalie initiale. C'est le cas du lymphome folliculaire où la t(14;18) survient au cours de la recombinaison V(D)J, alors que la tumeur possède des caractéristiques très proches de celles d'un CG normal : une architecture nodulaire, un microenvironnement

similaire composé de lymphocytes T et d'un réseau de cellules folliculaires dendritiques, et l'expression de marqueurs des cellules B normales du CG comme CD10 et BCL-6 (Bahler, Blood 1991 ; Bahler, Proc Natl Acad Sci USA 1992).

### ➤ **Cellule B normale d'origine**

Pour classer les lymphomes B en vue d'adapter à chaque lymphome un traitement spécifique optimal, il semble pertinent de rapporter le lymphome au stade de différenciation dont la cellule tumorale est le plus proche en terme de phénotype, plutôt qu'au stade où l'anomalie génétique est survenue. La dernière classification des lymphomes (OMS 2001) prend en compte, en plus des critères histologiques, des critères de biologie moléculaire et d'évolution clinique. Elle est en partie basée sur le fait que les cellules B malignes seraient figées à un stade particulier de la différenciation B normale qui reflèterait leur origine, d'où le concept de « cellule B d'origine » des lymphomes B (Tableau 3).

L'étude des gènes des Igs permet de faire la différence entre une cellule B naïve (gènes non mutés) et une cellule du CG ou post-CG (gènes mutés). La plupart des lymphomes non hodgkiniens porte la marque du processus d'hypermutation somatique. Cependant, la mise en évidence de ce processus en dehors du CG (Weller, Proc Natl Acad Sci USA 2001) implique que les lymphomes présentant des signes d'hypermutation somatique ne sont peut-être pas tous dérivés d'une cellule du CG ou ayant transité par celui-ci. Dans les cellules tumorales de certains lymphomes, le processus d'hypermutation somatique est en cours (mutations « ongoing »), ce qui suggère que ces cellules sont arrêtées au stade de différenciation correspondant à une cellule du CG et non à une cellule post-CG.

Récemment, de nouvelles approches technologiques, par « gene array », ont permis de préciser les rapports cellules tumorales/cellules B normales.

**Tableau 3 : Origine cellulaire des lymphomes B matures**

<b>Type</b>	<b>Cellule d'origine supposée</b>
<b>Lymphome du manteau</b>	Cellule B naïve CD5 <sup>+</sup> de la zone du manteau
<b>Lymphome folliculaire</b>	Cellule B du CG
<b>Lymphome de Burkitt</b>	Centroblaste (EBV) Cellule B tardive du CG/ cellule post-CG (EBV <sup>+</sup> )
<b>Lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire</b>	Cellule B du CG
<b>Lymphome de Hodgkin classique</b>	Cellule B du CG avec BCR non fonctionnel, sauvée de l'apoptose
<b>Lymphome B diffus à grandes cellules forme « germinal center B-like »</b>	Cellule B du CG
<b>Lymphome B diffus à grandes cellules forme « activated B-like »</b>	Cellule B post-CG
<b>LLC/lymphome lymphocytaire</b>	Gènes Igs non mutés : cellule B naïve Gènes Igs mutés : cellule B post-CG
<b>Lymphomes de la zone marginale</b>	Cellule B post-CG de la zone marginale
<b>Lymphome lymphoplasmocytaire</b>	Cellule B post-CG engagée dans la voie de différenciation plasmocytaire
<b>Myélome</b>	Plasmocyte

### *Lymphome B diffus à grandes cellules*

Le lymphome B diffus à grandes cellules est le lymphome le plus fréquent, représentant environ 30% des lymphomes B non hodgkiniens. Il s'agit d'un groupe hétérogène de lymphomes agressifs. Bien que la plupart des patients répondent initialement à la chimiothérapie, moins de la moitié d'entre eux sont placés en rémission durable. Les paramètres cliniques sont insuffisants pour prédire l'évolution clinique de la maladie. Les travaux actuels visent à déterminer des paramètres biologiques permettant l'individualisation de sous-groupes de biologie et d'évolution distinctes, dans le but de personnaliser le traitement de ces lymphomes.

La présence de mutations caractéristiques du phénomène d'hypermutation somatique dans les gènes des Igs suggère que les lymphomes B diffus à grandes cellules dérivent d'une cellule du CG ou d'une cellule post-CG (Lossos, Proc Natl Acad Sci USA 2000). La plupart ont accompli la commutation de classe (Rosenwald, N Eng J Med 2002).

Alizadeh et coll. ont utilisé la technique de la puce à ADNc en regroupant sur une puce appelée « lymphochip » plus de 17 000 gènes préférentiellement exprimés dans les cellules lymphoïdes et/ou au rôle important dans l'immunité et dans l'oncogénèse (Alizadeh, Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1999). Avec cette puce, ils ont analysé des échantillons de tissus lymphoïdes normaux et tumoraux, dont des lymphomes B diffus à grandes cellules de survenue *de novo* (Alizadeh, Nature 2000). Tout d'abord, les auteurs ont identifié une signature unique d'expression génique caractéristique du stade de différenciation du CG, impliquant plusieurs centaines de gènes incluant des marqueurs connus du CG, comme CD10 et BCL6, et de nombreux gènes de fonction encore inconnue. Ce profil indique une origine du CG et non un simple passage par celui-ci. Une hiérarchisation de regroupement par traitement informatique des données a permis de mettre en évidence trois sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules au profil d'expression différent (Alizadeh, Nature 2000). Le sous-type « germinal center B-cell like » est caractérisé par l'expression des gènes qui définissent la signature du CG. Le sous-type « activated B-cell like » exprime de nombreux gènes induits dans les cellules B du sang périphérique après activation *in vitro*. Dans ce sous-type, le niveau

d'activation de NF- $\kappa$ B et de ses gènes cibles est élevé, alors qu'il est bas dans le sous-type « germinal center B-cell like ». Les lymphomes « germinal center B-cell like » présentent un haut niveau de mutations somatiques avec des signes de mutation « en cours », en faveur d'une origine d'une cellule du CG. Un haut niveau de mutations somatiques est également observé dans la majorité des lymphomes « activated B-cell like », mais sans signe de mutation « en cours », ce qui suggère une origine plutôt post-CG pour ces derniers (Lossos, Proc Natl Acad Sci USA 2000). Fait intéressant, ces deux sous-types se distinguent aussi par une différence significative de pronostic avec une survie statistiquement meilleure dans le sous-type « germinal center B-cell like » (survie moyenne à 5 ans : 76% pour les « germinal center B-cell like » contre 16% pour les type « activated B-cell like »). Un troisième sous-type différent des deux premiers, hétérogène en terme d'expression génique, a également été mis en évidence. Ce troisième sous-type, nommé type 3, a été assimilé au groupe des lymphomes « activated B-cell like » en raison de leur évolution clinique similaire, les deux sous-types constituant ensemble le groupe « non germinal center B-cell like ». Les lymphomes « germinal center B-cell like » représenteraient environ la moitié des lymphomes B diffus à grandes cellules, les formes « activated B-cell like » 30% et le type 3 20%.

L'étude d'expression génique sur puce à ADNc est une technique lourde et coûteuse. L'utilisation des marqueurs CD10, BCL-6 et MUM1, en immunohistochimie sur coupes de tissu fixé et en inclus en paraffine, permet de classer de façon fiable les lymphomes B diffus à grandes cellules en deux sous-types: « germinal center B-cell like » et non « germinal center B-cell like » (Hans, Blood 2004).

Une étude récente a révélé que les lymphomes B primitifs du médiastin, qui correspondent à une forme anatomo-clinique particulière de lymphome B diffus à grandes cellules, ont un profil d'expression génique plus proche des lymphomes de Hodgkin que des autres lymphomes B diffus à grandes cellules (Rosenwald, J Exp Med 2003).

### *Lymphome folliculaire*

Comme nous l'avons vu, de nombreux arguments sont en faveur de l'origine d'une cellule du CG pour les lymphomes folliculaires. Morphologiquement, le lymphome folliculaire possède

certaines caractéristiques d'un CG normal et exprime des marqueurs de cellules B normales du CG. De plus, l'étude des gènes des Igs montre des signes d'hypermutation avec des mutations « en cours » dans la population tumorale. Enfin, les études réalisées à l'aide de puce à ADNc montrent l'expression par ces lymphomes de la signature du CG, pratiquement inchangée par rapport aux cellules normales du CG (Alizadeh, Nature 2000). En revanche la survie semble être associée à la nature des cellules immunes infiltrant la tumeur. Une étude récente montre en effet que la survie de patients atteints par un lymphome folliculaire peut être prédite à l'aide de deux signatures « de survie », comprenant des gènes préférentiellement exprimés non pas par les cellules tumorales mais par les cellules de l'infiltrat réactionnel, comme les lymphocytes T et les macrophages (Dave, N Engl J Med, 2004).

#### *Leucémie lymphoïde chronique (LLC)/ lymphome lymphocytaire*

La leucémie lymphoïde chronique est caractérisée par une accumulation dans le sang de cellules lymphoïdes B de petite taille, positives pour CD5 et exprimant faiblement les Igs de surface. Des adénopathies tumorales sont également observées. Dans la forme purement ganglionnaire que représente le lymphome lymphocytaire, l'hyperlymphocytose sanguine est absente (OMS 2001). L'évolution clinique de cette pathologie est variable, souvent indolente, avec des formes de survie longue (293 mois) ou plus courte (95 mois) (Hamblin, Blood 1999). Cette variabilité d'évolution clinique est superposable au caractère muté ou non des gènes des Igs. Dans 50 à 60% des cas de LLC, il existe des signes d'hypermutation somatique, sans mutations « en cours », en faveur d'une origine post-CG ou « mémoire ». Dans les autres cas, qui correspondent aux formes cliniques agressives, les gènes des Igs ne sont pas mutés, ce qui suggérerait une origine à partir d'une cellule B pré-CG ou naïve (Fais, J Clin Invest 1998 ; Hamblin 1999 ; Damle, Blood 1999). Dans l'hypothèse que les LLC correspondraient à deux entités différentes, leur profil d'expression génique a été analysé sur puce à ADNc. Contrairement à ce qui était attendu, cette nouvelle étude a montré que les LLC correspondent à un groupe homogène pour leur profil d'expression génique, permettant de les différencier d'autres lymphomes et de les rapprocher d'une cellule B mémoire. Il existe bien une différence d'expression génique entre les deux groupes mutés ou non mutés, mais qui

consiste en l'expression différentielle d'un faible nombre de gènes (Klein, J Exp Med 2001 ; Ferrer, Cancer Genet Cytogenet 2004).

Les études de profil d'expression génique ont été majoritairement réalisées sur les LLC, moins souvent sur les lymphomes lymphocytiques. Une étude récente montre que ces lymphomes présentent un profil similaire à celui des LLC (Thiéblemont, Blood 2004). En conclusion, les leucémies lymphoïdes chroniques/lymphomes lymphocytiques correspondent probablement à une même maladie avec deux variants moléculaires et évolutifs principaux.

#### *Lymphome de Hodgkin classique*

L'origine cellulaire du lymphome de Hodgkin classique a été difficile à mettre en évidence en raison de l'absence d'expression de marqueur phénotypique B ou T dans la majorité des cas et de la faible abondance des cellules tumorales. C'est l'analyse par PCR des gènes des Igs de cellules tumorales microdisséquées à partir de coupes tissulaires qui a permis de préciser la nature B des lymphomes de Hodgkin dans la majorité des cas (Kuppers, Proc Natl Acad Sci USA 1994 ; Kanzler, J Exp Med 1996). Actuellement, l'hypothèse privilégiée est que les cellules tumorales dériveraient de cellules B du CG défectives, incapables d'exprimer un BCR de haute affinité mais qui auraient échappé à l'apoptose et régulé négativement l'expression des gènes spécifiques de la différenciation B (Marafioti, Blood 2000 ; Kuppers, Nat Rev Cancer 2005).

#### *Lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire nodulaire*

Cette forme de lymphome de Hodgkin est rare et de bon pronostic habituellement. Contrairement aux formes classiques, les cellules tumorales expriment le marqueur B CD20. Elles sont peu nombreuses, situées dans des nodules ressemblant à de volumineux follicules lymphoïdes anormaux constitués par des petits lymphocytes B non tumoraux, des cellules folliculaires dendritiques et quelques lymphocytes T. L'expression par la majorité des cellules tumorales de la protéine AID, suggère une origine d'une cellule B du CG (Greiner, J Pathol 2005). Ceci est en accord avec le fait que les gènes des Igs des cellules tumorales montrent un



niveau élevé de mutations avec des signes de mutations « en cours » (Marafioti, N Engl J Med 1997 ; Braeuninger, Proc Natl Acad Sci USA 1997 ; Ohno, N Engl J Med 1997).

### *Lymphome de Burkitt*

Sur les caractéristiques morphologiques et le phénotype des cellules tumorales, CD10<sup>+</sup>, CD77<sup>+</sup>, BCL6<sup>+</sup>, certains auteurs ont émis l'hypothèse que les lymphomes de Burkitt ont pour origine les centroblastes du CG. Les études des gènes des Igs ont montré de nombreuses mutations, « en cours » dans certains cas, suggérant que les lymphomes de Burkitt auraient pour origine une cellule du CG ou une cellule post-CG (Tamaru, Am J Pathol 1995 ; Chapman, Blood 1995 ; Chapman, Blood 1996). Toutefois, ces études ont le plus souvent été réalisées sur des lignées cellulaires. L'étude récente des gènes des Igs d'une importante série de lymphomes de Burkitt endémiques, sporadiques et associés au VIH, montre que la cellule d'origine est différente pour les lymphomes de Burkitt selon qu'ils sont associés ou non à l'EBV (Bellan, Blood 2005). Les lymphomes de Burkitt sporadiques EBV<sup>-</sup> pourraient dériver de centroblastes précoces alors que les lymphomes de Burkitt EBV<sup>+</sup> dériveraient soit d'une cellule B du GC tardive engagée dans la différenciation terminale vers une cellule « mémoire », soit d'une cellule B « mémoire ».

### *Syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation*

Le séquençage des gènes de la partie variable des Igs des cellules tumorales dans les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation montre que les cellules tumorales dérivent de cellules d'origine très variée : cellule naïve, cellule « mémoire » ou cellule présentant des mutations des gènes des Igs non fonctionnelles avec, dans une minorité de cas, des signes de mutation « en cours », évocatrices d'une origine d'une cellule B du CG (Young, Nat Rev Cancer 2004).

### *Lymphomes du manteau*

L'identification des lymphomes du manteau repose sur des critères morphologiques et sur la translocation t(11;14) ou la surexpression de la cycline D1. Il s'agit d'un lymphome incurable

dont la survie moyenne est de 3 ans avec des extrêmes allant de moins de 1 an à plus de 10 ans. Sur des arguments morphologiques et phénotypiques, le lymphome du manteau est supposé dériver d'une cellule B naïve CD5<sup>+</sup> de la zone du manteau. L'analyse des gènes des Igs montre l'absence de mutation somatique, ce qui est en accord avec une origine pré-CG. Une analyse d'expression génique sur puce à ADNc a permis d'identifier un profil d'expression particulier permettant de prédire la survie : la signature « prolifération », quand elle est présente, est associée à une survie courte (Rosenwald, Cancer Cell 2003). Elle regroupe des gènes exprimés à un plus haut niveau dans les cellules en division que dans les cellules quiescentes, comme des gènes intervenant dans la réplication de l'ADN ou dans la progression dans le cycle cellulaire.

#### *Lymphomes de la zone marginale*

Les lymphomes de la zone marginale correspondent à plusieurs entités anatomo-cliniques : les lymphomes de la zone marginale de la rate, les lymphomes de la zone marginale ganglionnaires et les lymphomes du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT). Les deux premiers sont rares, le troisième plus fréquent. Ces lymphomes présentent des signes témoignant du processus d'hypermutation somatique et dériveraient d'une cellule B post-CG « mémoire ».

#### *Lymphome lymphoplasmocytaire*

Les lymphomes lymphoplasmocytaires sont des proliférations de lymphocytes B de petite taille, de cellules à différenciation plasmocytaire et de plasmocytes, infiltrant la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate. Les cellules tumorales n'expriment pas CD5. La majorité des patients ont une IgM sérique monoclonale compliquée d'hyperviscosité sanguine ou de cryoglobulinémie. Chez les autres patients, les cellules tumorales produisent des Igs mais ne les secrètent pas. Les gènes des Igs présentent des signes d'hypermutation somatique. Les cellules tumorales dériveraient d'une cellule post-CG.

## *Myélome*

Le myélome est une prolifération maligne de plasmocytes infiltrant la moelle. Il est apparenté à la gammopathie monoclonale et au plasmocytome solitaire osseux, qui correspondraient à des stades plus précoces de la maladie. Le myélome se manifeste par une anémie, des lésions lytiques osseuses, une hypercalcémie, une insuffisance rénale et une immunodépression. Contrairement aux autres tumeurs malignes hématopoïétiques, les myélomes présentent une grande instabilité génomique et des anomalies génétiques complexes (Sawyer, Cancer Genet Cytogenet 1995). Des translocations impliquant les locus IgH sont néanmoins observées dans la plupart des cas (Kuehl, Nat Rev Cancer 2002). L'analyse des gènes des Igs montrent des signes d'hypermutation somatique. Des études du profil d'expression génique sur puce à ADNc en comparaison avec les plasmocytes normaux permettent de classer les myélomes en plusieurs catégories d'évolution différentes (Zhan, Blood 2003).

## **OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Quand nous avons commencé notre étude en décembre 2001, l'identification de p28 et de l'IL-27 par le groupe de Rob Kastelein n'avait pas encore fait l'objet d'une publication. Nous disposions de données confidentielles sur la mise en évidence de la nouvelle cytokine hétérodimérique, son rôle supposé dans la réponse Th1, et des données de profil d'expression obtenues par analyse par RT-PCR quantitative. La mise en évidence de l'hétérodimère EB13p28 reposait initialement sur des résultats obtenus *in vitro* en co-transfectant les gènes codant pour les deux sous-unités. Son existence en conditions physiologiques *in vivo* n'avait pas encore été démontrée, et son expression et son rôle en immunopathologie humaine étaient largement inconnus.

Les travaux antérieurs du groupe avait montré que des lignées B infectées *in vitro* par l'EBV expriment fortement EB13, et que son expression est induite *in vitro* par la protéine oncogénique virale LMP1, via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Mon projet de thèse a consisté dans un premier temps à analyser l'expression *in situ* de l'IL-27 dans les lymphoproliférations

liées à l'EBV, afin d'évaluer son rôle potentiel dans le développement de ces lymphomes. Il nous a semblé intéressant d'étudier en parallèle les lymphoproliférations liées au virus HTLV-1, celui-ci présentant des similarités avec l'EBV, en particulier certaines propriétés oncogéniques de la protéine Tax, dont l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Au cours de cette étude, nous avons également analysé d'autres lymphomes B et T, non viro-induits, afin d'évaluer la spécificité des résultats obtenus dans les lymphoproliférations viro-induites. Alors que nous n'avons détecté aucune expression des deux sous-unités de l'IL-27 dans les lymphocytes T normaux ou dans les lymphomes T non associés à l'EBV ou l'HTLV-1, nous avons observé une expression d'EBI3 dans certains lymphomes B non viro-induits ainsi que dans des cellules normales du GC de ganglions réactionnels. Ceci nous a conduit à analyser dans un deuxième temps l'expression de l'IL-27 dans une série de lymphomes B de différents types histologiques, et à étudier en parallèle l'expression et le rôle de l'IL-27 au cours de la différenciation B normale.

# **RESULTATS**

# **PARTIE I**

**Mise au point des conditions de détection  
de la sous-unité p28 de l'IL-27 en immunohistochimie**

**Article :**

Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases.

Frédérique Larousserie, Stefan Pflanz, Aurore Coulomb-L'Herminé, Nicole Brousse,  
Rob Kastelein, Odile Devergne

The Journal of Pathology 2004 ; 202 : 164-171

Dans le but d'étudier l'expression de l'IL-27 *in situ* dans les lymphoproliférations humaines, nous avons préalablement dû mettre au point les conditions de détection de la sous-unité p28 *in situ* chez l'Homme. Grâce à une collaboration avec Rob Kastelein et Stefan Pflanz (DNAX Research Institute), nous avons pu obtenir et tester 2 anticorps polyclonaux de lapin et 4 anticorps monoclonaux de rat dirigés contre p28, développés dans leur institut. En ce qui concerne EBI3, nous disposions d'un anticorps monoclonal de souris développé dans le groupe, permettant la réalisation d'études *in situ* sur tissu fixé et inclus en paraffine (Devergne, Am J Pathol 2001).

Compte-tenu des premiers résultats connus sur l'IL-27, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-27 pourrait être exprimée *in situ* dans des pathologies granulomateuses associées à une réponse Th1. En effet, les premières données obtenues *in vitro* et *in vivo* avec les souris IL-27R<sup>-/-</sup> suggéraient que l'IL-27 joue un rôle important dans l'initiation de la réponse Th1. D'une part, les transcrits des deux chaînes EBI3 et p28 sont co-exprimés *in vitro* dans les monocytes et les cellules dendritiques dérivées de monocytes, après activation. D'autre part, l'IL-27 stimule *in vitro* la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et leur production d'IFN- $\gamma$  en synergie avec l'IL-12 (Pflanz, Immunity 2002). Enfin, deux études avaient montré que les souris déficientes pour l'IL-27R ont un défaut d'initiation de la réponse immune Th1 au cours de l'infection par *Listeria monocytogenes* ou par *Leishmania major* (Chen, Nature 2000 ; Yoshida, Immunity 2001) et ont un défaut de formation des granulomes au cours de l'infection par une mycobactérie, le bacille de Calmette et Guérin (Yoshida, Immunity 2001). En nous basant sur l'ensemble de ces données, nous avons testé l'expression d'EBI3 et de p28 *in situ* chez l'Homme dans trois pathologies granulomateuses connues pour être associées à un profil cytokinique Th1 : la tuberculose, la sarcoïdose et la maladie de Crohn. Ces trois maladies sont caractérisées histologiquement par la présence de structures spécifiques : les granulomes épithélioïdes et/ou géo-giganto-cellulaires, qui sont constitués de macrophages et de cellules dérivées de macrophages, les cellules épithélioïdes et les cellules géantes multinucléées, ainsi que de lymphocytes T, le plus souvent CD4<sup>+</sup>.

Nous avons analysé l'expression d'EBI3 et de p28 sur des coupes sériées pour chaque cas de tuberculose (n=9), de sarcoïdose (n= 8) et de maladie de Crohn (n=7). Pour la

tuberculose et la sarcoïdose, nous avons étudié des ganglions lymphatiques. Pour la maladie de Crohn, qui est une maladie inflammatoire chronique intestinale, nous avons analysé des fragments de paroi intestinale et des ganglions lymphatiques. En parallèle, nous avons analysé des tissus contrôles : des ganglions lymphatiques présentant une hyperplasie folliculaire d'origine inconnue (n=14), et des fragments de paroi intestinale non impliqués dans une maladie inflammatoire (n=11).

Nous avons montré que les macrophages, les cellules épithélioïdes et les cellules géantes multinucléées des granulomes coexpriment EBI3 et p28, ce qui était en accord avec les données décrites *in vitro*. En plus de ces types cellulaires, nous avons montré que les cellules endothéliales et les plasmocytes co-expriment également EBI3 et p28. Alors qu'*in vitro*, les cellules dendritiques dérivées de monocytes produisent de l'IL-27 après activation (Pflanz, Immunity 2002), nous avons détecté une expression forte d'EBI3 dans les cellules dendritiques des zones T ganglionnaires ou des plaques de Peyer de l'intestin, en l'absence d'expression détectable de p28. De plus, les lymphocytes T situés dans ou en dehors des granulomes n'exprimaient pas EBI3 ni p28.

Cette première étude a permis de mettre au point les conditions de détection de p28 *in situ* chez l'Homme sur tissus fixés et inclus en paraffine. De plus, nous avons montré la présence des deux sous-unités de l'IL-27 dans des pathologies humaines associées à une réponse Th1, ce qui est en faveur d'un rôle de l'IL-27 dans la réponse immune Th1 chez l'Homme.



Original Paper

## Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases

Frédérique Larousserie,<sup>1,2</sup> Stefan Pflanz,<sup>3†</sup> Aurore Coulomb-L'Herminé,<sup>4</sup> Nicole Brousse,<sup>2</sup> Rob Kastelein<sup>3</sup> and Odile Devergne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CNRS FRE 2444, Université Paris V, IFR Necker, Paris, France

<sup>2</sup>UPRES EA 219, Service d'Anatomie Pathologique, AP-HP, Hôpital Necker, Paris, France

<sup>3</sup>DNAX Research Institute, Palo Alto, USA

<sup>4</sup>Service d'Anatomie Pathologique, AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Clamart, France

\*Correspondence to:

Odile Devergne, CNRS FRE 2444, Hôpital Necker, Bâtiment Sèvres, 161 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France.  
E-mail: devergne@necker.fr

†Micromet AG, München, Germany.

### Abstract

**Interleukin (IL)-27 is a newly described member of the IL-12 family. It is a heterodimeric cytokine composed of two subunits, p28 and Epstein–Barr virus-induced gene 3 (EBI3). *In vitro* studies have shown that IL-27 is mainly produced by activated monocytes and dendritic cells. It induces the proliferation of naïve CD4-positive T cells and synergizes with IL-12 for interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production. Knock-out mice for the IL-27 receptor (WSX-1/TCCR) have impaired Th1 responses and form abnormal granulomas when injected with bacillus Calmette–Guérin. However, the expression profile of IL-27 *in vivo* is currently unknown. To investigate the potential role of IL-27 in the development of a Th1 response in humans *in vivo*, this study has analysed the *in situ* expression of IL-27 subunits in three types of granulomatous disease (tuberculosis, sarcoidosis, and Crohn's disease), each characterized by a Th1 response. Tissue sections from patients with tuberculosis ( $n = 9$ ), sarcoidosis ( $n = 8$ ), or Crohn's disease ( $n = 7$ ) were analysed by immunohistochemistry with anti-EBI3 and anti-p28 antibodies, in parallel with control tissues (control reactive lymph nodes,  $n = 14$ , and control intestinal tissues,  $n = 11$ ). In granulomatous tissues, EBI3 and p28 co-expression was detected in epithelioid and multinucleate giant cells in granulomas. In addition, sinus or tissue macrophages, endothelial cells, and plasma cells were found to co-express EBI3 and p28. These data support a possible role for IL-27 in human Th1 responses. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.**

**Keywords:** cytokine; IL-27; sarcoidosis; tuberculosis; Crohn's disease; Th1 response; granuloma

Received: 6 August 2003  
Revised: 30 September 2003  
Accepted: 24 October 2003

### Introduction

Interleukin (IL)-27 is a newly described cytokine of the IL-12 family [1]. IL-12 is a heterodimeric cytokine composed of two subunits, p40 and p35. It is expressed by antigen-presenting cells (APCs) and plays a pivotal role in driving IFN- $\gamma$  production and the development of a Th1 immune response [2]. Similar to IL-12, IL-27 comprises two chains, Epstein–Barr virus-induced gene 3 (EBI3), an IL-12 p40-related protein [3], and p28, a novel IL-12 p35-related polypeptide. *In vitro* studies have shown that EBI3 and p28 are both up-regulated in activated monocytes and dendritic cells, suggesting that APCs are the main source of IL-27. IL-27 induces the proliferation of CD4-positive naïve T cells, but not memory T cells, and synergizes with IL-12 for IFN- $\gamma$  production by CD4-positive naïve T cells. IL-27 binds to TCCR (also known as WSX-1), a receptor highly expressed on naïve T cells [1]. Two groups have demonstrated that TCCR-deficient mice have a defect in Th1 response initiation. When challenged *in vivo* with protein antigen,

TCCR-/- mice had an impaired Th1 response, as assessed by decreased IFN- $\gamma$  production and increased IL-4 production [4]. TCCR-/- mice also showed increased susceptibility to infection with two intracellular pathogens, *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* [4,5], and abnormal granuloma formation when infected with bacillus Calmette–Guérin [5]. Taken together, these studies suggest that IL-27 may play a critical role in the initiation of Th1 responses [6].

The expression and role of IL-27 in human immune pathology are currently unknown. Therefore, to evaluate its potential role in the development of Th1 responses in humans, we have analysed the *in situ* expression of IL-27 in three human granulomatous diseases, tuberculosis, sarcoidosis, and Crohn's disease (CD), associated with a Th1-type response. All three pathologies are characterized by the accumulation of macrophages and CD4-positive T lymphocytes, and the formation of epithelioid granulomas at the sites of involvement.

Tuberculosis is caused by infection with an intracellular pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. Animal models and human studies have shown that the IL-12/IFN- $\gamma$  axis plays a central role in the development of anti-mycobacterial responses and the formation of granulomas [7]. In particular, increased expression of IFN- $\gamma$ , IL-12, and IL-12R $\beta$ 2 has been observed in lymph nodes, bronchoalveolar lavage cells, and pleural fluid of non-immunocompromised tuberculous patients [8–15]. IL-18, a cytokine that synergizes with IL-12 for IFN- $\gamma$  production, was also found to be up-regulated in the serum and pleural fluid of tuberculous patients [15,16]. Similarly, in sarcoidosis, a chronic granulomatous disease of unknown origin, the prevalence of a local Th1 response has been demonstrated, as assessed by increased production of IFN- $\gamma$ , IL-12 p40, IL-12R $\beta$ 1/ $\beta$ 2, and IL-18 at the sites of inflammation [9,12,17–19].

CD is a chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract, characterized by infiltration of the lamina propria with CD4-positive T lymphocytes and macrophages and the formation of granulomas in the intestinal wall and mesenteric lymph nodes. Although the origin of CD is unknown, abnormal activation of the mucosal immune system by bacterial antigens has been proposed and Th1 cells have been suggested to play a key role in the development of the disease [20,21]. CD4-positive T cells purified from the lamina propria of CD patients or CD4-positive T-cell clones generated *in vitro* from the mucosa of CD patients display a Th1-type pattern of cytokine gene expression when stimulated *in vitro* [22,23]. *In vivo*, increased levels of IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18, and IL-12R $\beta$ 2 were detected in mucosal tissues or sera from CD patients [24–29]. *In situ* analyses have shown elevated numbers of IFN- $\gamma$ -positive T lymphocytes and of IL-12-positive macrophages, as well as increased expression of IL-18 by macrophages and dendritic cells infiltrating the lamina propria of CD patients [23,27,29]. In CD granulomas, lymphocytes were positive for IFN- $\gamma$ , while epithelioid and multinucleate giant cells were positive for IFN- $\gamma$  and IL-12 [30]. Similarly, T lymphocytes present within tuberculous or sarcoid granulomas were the major source of IFN- $\gamma$  [8,17] and

epithelioid and multinucleate giant cells of sarcoid granulomas expressed IL-12 and IL-18 [19].

In this study, we analysed by immunohistochemistry expression of the two subunits of IL-27, EB13 and p28, at the sites of involvement in tuberculosis, sarcoidosis, and CD patients, and showed that both subunits are co-expressed by epithelioid and multinucleate giant cells in the granulomas. Other cell types, such as macrophages, endothelial cells, and plasma cells, were also found to co-express EB13 and p28. These *in vivo* observations provide the first evidence that IL-27 is expressed in Th1-associated human granulomatous diseases.

## Materials and methods

### Antibodies

Anti-EB13 2G4H6 mouse monoclonal antibody (MAb) (IgG2a) has been previously described [31]. Anti-p28 Abs were developed at DNAX. Rabbit polyclonal Abs against p28 were affinity-purified from the serum of rabbits immunized with an N-terminal peptide of human p28 (FPRPPGRPQLSLQEC) coupled to KLH. An anti-p28 rat MAb (clone 29B5) was obtained by immunizing rats with purified recombinant human IL-27. Other antibodies were obtained from commercial sources (Table 1).

### Tissue biopsies

Lymph node biopsies from 17 patients with sarcoidosis ( $n = 8$ ) or tuberculosis ( $n = 9$ ) were analysed. All biopsies were performed for diagnosis purposes and none of the patients had received specific therapy at the time of the biopsy. Control biopsies included 14 lymph nodes exhibiting follicular hyperplasia of unknown origin. Specimens from therapeutic intestinal resection from seven patients with active CD were analysed. Five samples were from the involved areas of the intestinal wall (large bowel,  $n = 2$ ; ileum,  $n = 2$ ; and appendix,  $n = 1$ ) and two samples were from the mesenteric draining lymph nodes. Control intestinal tissues (large and small bowel,  $n = 9$ ; appendix,

**Table 1.** Antibody characteristics

Specificity	Clone	Species/isotype	Dilution or concentration	Source
Specific antibodies				
EB13	2G4H6	Mouse IgG2a	1.25–4 $\mu$ g/ml	Devergne [31]
p28	Polyclonal	Rabbit IgG	1 $\mu$ g/ml	DNAX
p28	29B5	Rat IgG2a	10 $\mu$ g/ml	DNAX
CD68	KP-1	Mouse IgG1	1 : 3000	DakoCytomation
Macrophage	3A5	Mouse IgG2b	1 : 80	Novocastra Laboratories Ltd
Fascin	IM20	Mouse IgG1	1 : 200	Novocastra Laboratories Ltd
Control antibodies				
	RPC5	Mouse IgG2a	1.25–4 $\mu$ g/ml	Cappel Durham
	Polyclonal	Rabbit IgG*	1 $\mu$ g/ml	Sigma
	Polyclonal	Rat IgG*	10 $\mu$ g/ml	Sigma

\* Rabbit and rat IgG correspond to polyclonal IgG purified from the sera of normal rabbit and rat, respectively.

$n = 2$ ) were obtained from unaffected areas of specimens from patients undergoing partial bowel resection for non-inflammatory bowel disorders (cancer, polyposis, congenital malformation, and intussusception). Abundant granulomas were present in all cases of granulomatous disease selected. All tissues analysed were collected for histological examination and diagnosis purposes and this study complies with the French ethical law for studies on human tissues.

### Immunohistochemistry

Paraffin wax sections were dewaxed, rehydrated, and subjected to antigen retrieval by heat pretreatment using citrate buffer. Endogenous peroxidase activity was quenched with a peroxidase-blocking solution (DakoCytomation). Slides were then incubated for 25 min with mouse primary MAbs. For immunostaining with rabbit primary Abs, slides were first saturated by incubation with Tris-buffered saline (TBS) containing 5% normal goat serum for 30 min prior to incubation for 25 min with the Abs. Binding of mouse or rabbit primary Abs was detected by an indirect avidin-biotin peroxidase technique (ChemMate detection kit, DakoCytomation). For immunostaining with rat primary Abs, slides were saturated with TBS containing 20% normal human serum for 30 min and then incubated for 1 h with rat Abs. Binding of rat Abs was detected using biotinylated rabbit anti-rat IgG (Vector Laboratories) at 10 µg/ml in TBS containing 2% normal human serum and 1% BSA, followed by incubation with peroxidase-conjugated streptavidin, as above. The peroxidase reaction was developed with 3'-diaminobenzidine (DakoCytomation) and sections were counterstained with ChemMate haematoxylin.

### Results

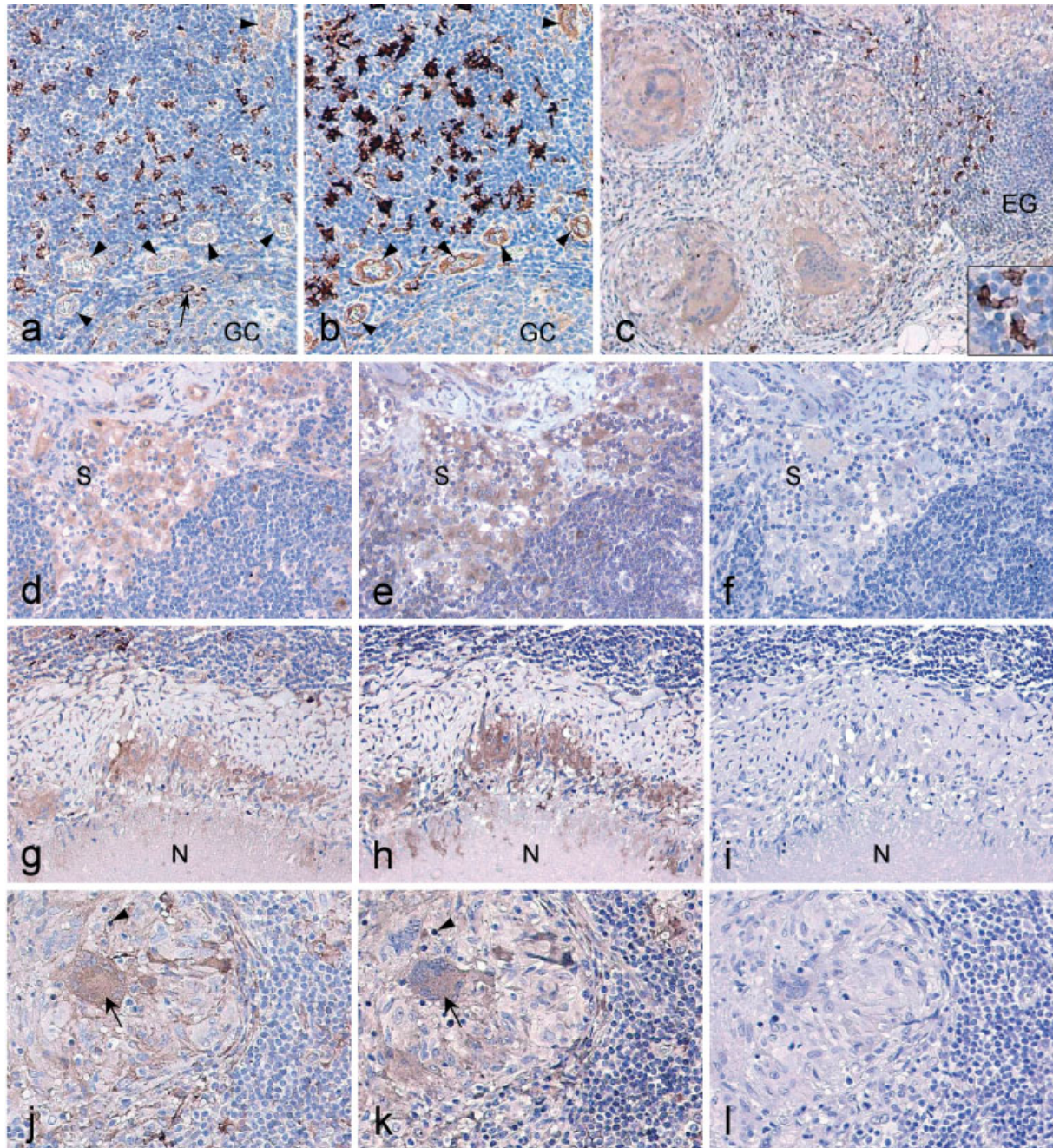
#### EBI3 and p28 expression in tuberculous and sarcoid lymph nodes

Lymph nodes from patients with tuberculosis ( $n = 9$ ) or sarcoidosis ( $n = 8$ ) were analysed by immunohistochemistry for expression of the two subunits of IL-27, EBI3 and p28. EBI3 expression was detected using a mouse MAb, 2G4H6 Ab [31]. p28 expression was detected using affinity-purified rabbit polyclonal antibodies directed against an N-terminal peptide of p28. In some cases, the specificity of p28 staining was verified with a rat anti-p28 MAb. Control tissues included 14 reactive lymph nodes exhibiting follicular hyperplasia. Control Abs were used in parallel to anti-EBI3 and anti-p28 antibodies and showed no signal.

In control lymph nodes, EBI3-positive cells were detected both in follicles and in interfollicular areas (Figure 1 and Table 2). In follicles, strong EBI3 cytoplasmic staining was observed in lymphoid cells (Figure 1a). These positive cells were preferentially

located at the margin of germinal centres and in some cases in the mantle zone, and were morphologically consistent with lymphoid blasts. Tingible body macrophages were negative in most cases. Weak diffuse EBI3 staining was occasionally seen in cells with a morphology consistent with follicular dendritic cells. In interfollicular areas, we observed strong EBI3 cytoplasmic staining of cells with abundant cytoplasm and extended cytoplasmic processes, morphologically consistent with dendritic cells (Figure 1a). To characterize these cells further, we analysed serial sections with fascin antibody and a macrophage marker, 3A5 antibody. Fascin antibody exhibits strong reactivity in dendritic cells and weak reactivity in macrophages [32], whereas 3A5 antibody reacts with macrophages only [33]. The distribution of EBI3-positive dendritic-appearing cells overlapped with that of cells strongly positive for fascin (ie dendritic cells), but not with that of the macrophage marker, providing further evidence that these cells are most likely dendritic cells (Figures 1a and 1b, and not shown). In the T zones of the nodes, strong EBI3 cytoplasmic staining was also observed in scattered lymphoid blasts (not shown). In addition, macrophages (mainly sinus macrophages and to a lesser extent, tissue macrophages), as well as endothelial cells, exhibited weak to moderate cytoplasmic staining with anti-EBI3 antibody (Figures 1a and 1d, and not shown). Serial section analysis with anti-p28 Abs showed that p28 staining overlapped only partially with that of EBI3. Macrophages and endothelial cells showed weak to moderate p28 cytoplasmic staining (Figures 1e and 1f, and not shown). Other p28-positive cells included plasma cells and fibroblasts, and cells with plasmacytic differentiation in germinal centres. EBI3-positive lymphoid blasts and dendritic cells did not stain with anti-p28 antibodies. Thus, in control lymph nodes, co-expression of EBI3 and p28 was mainly restricted to macrophages and endothelial cells (Table 2).

In tuberculous and sarcoid lymph nodes, EBI3-positive cells were detected within granulomas and in extragranulomatous tissue (Figures 1c, 1g, and 1j, and Table 2). In granulomas, epithelioid and multinucleate giant cells exhibited weak to moderate cytoplasmic staining with anti-EBI3 antibody, whereas infiltrating lymphocytes were negative. EBI3-positive dendritic-appearing cells were occasionally observed in granulomas. Staining of serial sections with anti-p28 antibodies showed that epithelioid and multinucleate cells of granulomas co-expressed p28 (Figures 1g–1i). As a mean, about 75% of sarcoid granulomas and 50% of tuberculous granulomas were positive for EBI3 and p28. About 80% of multinucleate giant cells were positive for EBI3 and p28 in both pathologies. Variable numbers of EBI3-positive cells were detected in the extragranulomatous tissue (Figure 1c). These included dendritic cells, endothelial cells, sinus macrophages, and occasionally lymphoid blasts. As observed in controls, endothelial cells and sinus macrophages also stained with anti-p28 Abs, whereas dendritic and



**Figure 1.** Immunohistochemical analysis of EB13 and p28 expression in tuberculous, sarcoid, and control lymph nodes. (a, b) Staining of serial sections from a control hyperplastic lymph node with anti-EB13 antibody (a) or anti-fascin antibody (b). Numerous EB13-positive cells morphologically consistent with dendritic cells are detected in the interfollicular area (a). Their distribution overlaps with that of cells strongly labelled with fascin, a marker of dendritic cells (b), but not with that observed with a macrophage marker (3A5 antibody, data not shown). Endothelial cells (arrow-head), which are weakly reactive with anti-fascin antibody, are also weakly labelled with anti-EB13 antibody. In addition, a few EB13-positive lymphoid cells are detected in the germinal centre (arrow). (c) EB13 staining in a sarcoid lymph node demonstrates that granulomas are stained with anti-EB13 antibody; note the presence of numerous EB13-positive cells in the extra-granulomatous tissue. Higher magnification (inset) shows that these cells have a morphology consistent with dendritic cells. (d–l) Serial sections of a control hyperplastic lymph node (d–f), a tuberculous lymph node (g–i), and a sarcoid lymph node (j–l) were labelled with anti-EB13 antibody (d, g, j), rabbit anti-p28 antibodies (e, h, k), or control rabbit antibodies (f, i, l). Sinus macrophages co-express EB13 and p28 (d–f). Similarly, epithelioid cells of a tuberculous granuloma (g–i), as well as epithelioid and multinucleate giant cells (arrow) of a sarcoid granuloma (j–l), are stained with EB13 and p28 antibodies. Lymphoid cells (arrow-head) infiltrating the granuloma are negative for EB13 and p28. A similar pattern of p28 staining was observed with rat anti-p28 29B5 antibody (data not shown). GC = germinal centre; EG = extra-granulomatous tissue; S = sinus; N = necrosis. Peroxidase technique, haematoxylin counterstain. Magnification:  $\times 200$  (a, b, d–f),  $\times 110$  (c),  $\times 160$  (g–i),  $\times 190$  (j–l)

lymphoid cells were negative. In addition, variable numbers of plasma cells stained positive for EB13 and p28 (Table 2).

Taken together, these data indicate that tuberculous and sarcoid lymph nodes are characterized by the specific co-expression of EB13 and p28 by epithelioid

**Table 2.** Summary of the main cell types labelled with EB13 and p28 antibodies

Epithelioid granulomas							
Ep & Mc	GC	Sinus Mc	DC	LB	EC	Fb	PC
Control LN							
EB13		+ (8/14)	+ (14/14)	+ (14/14)*	+ (12/14)	—	—
p28 <sup>†</sup>		+ (10/13)	—	—	+ (11/13)	+ (3/13)	+ (9/13)
Tuberculous/sarcoid LN							
EB13	+ (17/17)	+ (11/11) <sup>‡</sup>	+ (3/3) <sup>§</sup>	+ (17/17)	+ (4/17)*	—	+ (11/17)
p28	+ (17/17)	+ (11/11) <sup>‡</sup>	+ (2/3) <sup>§</sup>	—	—	+ (12/17)	+ (14/17)
Epithelioid granulomas							
Ep & Mc	GC	LP Mc	DC	LB	EC	Fb	PC
Control mucosal tissues							
EB13		+ (11/11)	+ (11/11)	+ (9/11)*	+ (2/11)	—	+ (5/11)
p28 <sup>†</sup>		+ (5/10)	—	—	+ (3/10)	—	+ (10/10)
Crohn's disease							
EB13	+ (7/7)	+ (5/5) <sup>‡</sup>	+ (5/5)	+ (7/7)	+ (3/7)	—	+ (5/7)
p28	+ (7/7)	+ (5/5) <sup>‡</sup>	+ (3/5)	—	+ (3/7)	+ (2/7)	+ (7/7)

Ep = epithelioid cell; Mc = macrophage; GC = multinucleate giant cell; LB = lymphoid blast; EC = endothelial cell; Fb = fibroblast; PC = plasma cell; LN = lymph node; LP = lamina propria; — = virtually no positive cells in all cases analysed; + = variable numbers of positive cells (figures in parentheses indicate the fraction of positive cases).

\* Positive cells were essentially located in and around lymphoid follicles.

<sup>†</sup> p28 staining was uninterpretable in one case.

<sup>‡</sup> GCs, were present in 11 of 17 tuberculous/sarcoid lymph nodes and 5 of 7 CD cases.

<sup>§</sup> Sinus macrophages were observed in 3 of 17 cases.

and multinucleate giant cells in granulomas. In addition, endothelial cells, sinus macrophages, and plasma cells co-expressed EB13 and p28 in these tissues.

### EB13 and p28 expression in Crohn's disease

Next, we analysed EB13 and p28 expression in the lamina propria and in granulomas infiltrating the intestinal wall and the mesenteric draining lymph nodes of CD patients ( $n = 7$ ). As controls, we analysed the expression of both subunits in intestinal specimens from patients with non-inflammatory bowel diseases ( $n = 11$ ).

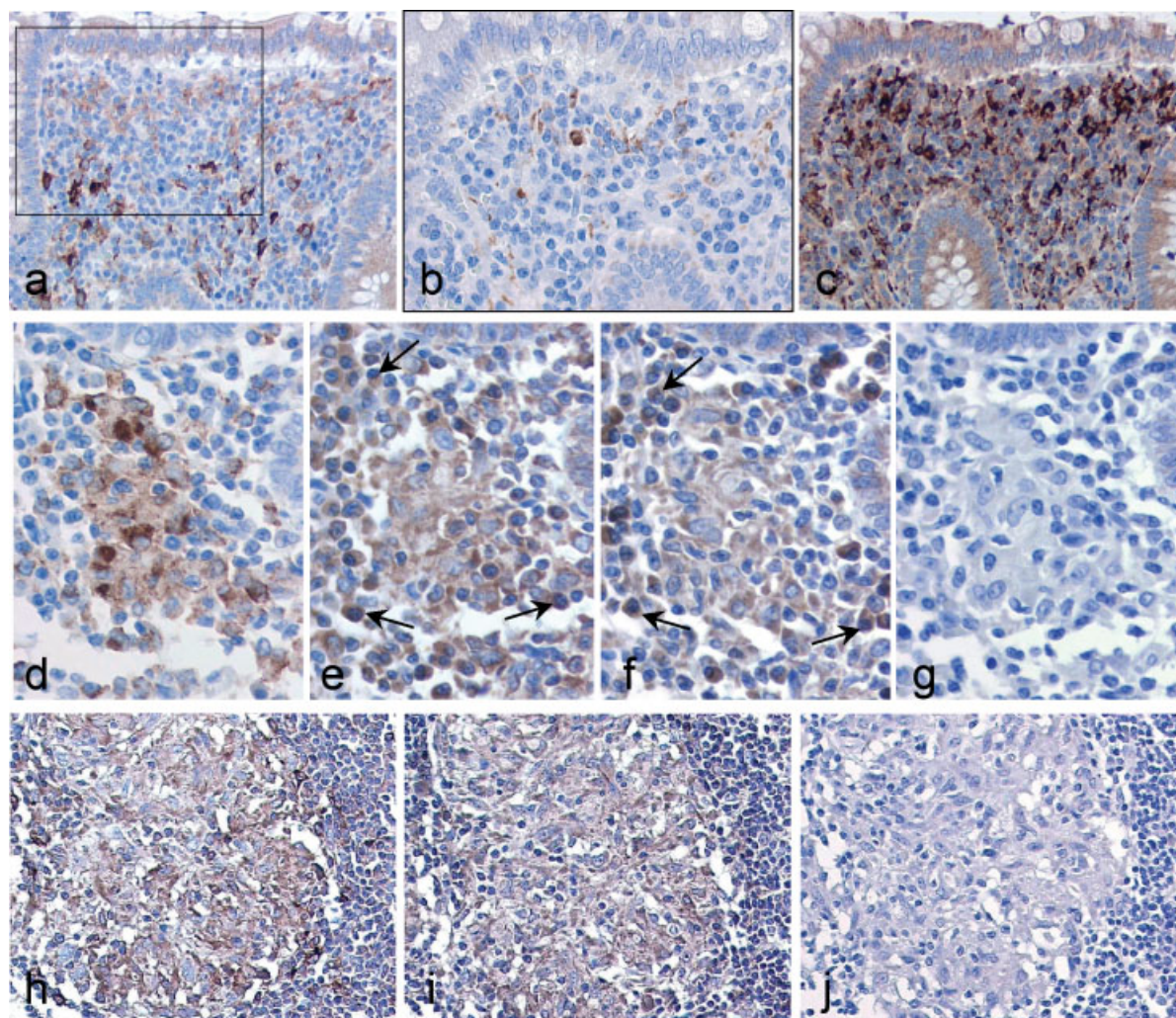
In controls, variable numbers of EB13-positive cells were detected in the lamina propria and in the gut-associated lymphoid tissue (GALT) (Figures 2a–2c and Table 2). In the lamina propria, scattered EB13-positive cells with a morphology consistent with macrophages or dendritic cells were present. Mucosal macrophages and dendritic cells are stained with CD68 antibody [34], whereas 3A5 antibody labels macrophages only [33]. Staining of serial sections with anti-EB13, anti-CD68, and 3A5 antibodies indicated that both macrophages and dendritic cells accounted for EB13 production in the lamina propria (Figures 2a–2c). Some macrophages also expressed p28, as shown by staining of serial sections with anti-p28 antibodies. In addition, numerous plasma cells infiltrating the lamina propria were labelled with anti-p28 antibodies. A fraction of these cells displayed weak EB13 reactivity. In the GALT, the EB13 staining pattern was similar to that observed in hyperplastic lymph nodes: strong EB13 staining was observed in

dendritic-appearing cells around follicles, while EB13 staining in follicles was largely restricted to lymphoid blasts. As previously observed in lymph nodes, these EB13-positive cells did not react with anti-p28 antibodies (Table 2).

In the lamina propria of CD patients, the pattern of EB13 and p28 reactivity was similar to that observed in control mucosal specimens (Table 2). EB13 and p28 co-expression was observed in plasma cells and macrophages infiltrating the lamina propria (Figures 2d–2g). As observed in sarcoid and tuberculous granulomas, CD granulomas, present in the intestinal wall or in mesenteric draining lymph nodes, were stained with anti-EB13 and anti-p28 antibodies. Staining was weak to moderate and was localized to the cytoplasm of epithelioid and multinucleate giant cells (Figures 2h–2j). As a mean, over 85% of the granulomas and the multinucleate giant cells were positive for EB13 and p28.

### Discussion

This study provides the first *in situ* analysis of IL-27 expression in human tissues. Our data indicate that EB13 and p28 are co-expressed *in vivo* in Th1-associated granulomatous diseases. Such data are consistent with previous *in vitro* studies and with the phenotype of TCCR<sup>-/-</sup> mice and suggest that local production of IL-27 may contribute, together with IL-12 and IL-18, to the initiation and development of a Th1 response and granuloma formation. Although IL-12 and IL-27 are similar, they are not redundant



**Figure 2.** Immunohistochemical analysis of EB13 and p28 expression in intestinal tissues from control (a–c) and CD patients (d–j). (a–c) Serial section analysis of the mucosa from a normal appendix with anti-EB13 antibody (a), 3A5 anti-macrophage antibody (b), and anti-CD68 antibody (c). Two types of EB13-positive cells are detected in the lamina propria: weakly positive cells morphologically consistent with macrophages, mainly located beneath the luminal epithelium, and strongly positive cells morphologically consistent with dendritic cells scattered throughout the lamina propria (a). Numerous CD68-positive cells (macrophages and/or dendritic cells) are scattered throughout the lamina propria (c), whereas 3A5-positive cells (macrophages) are preferentially located beneath the luminal epithelium (b), similar to cells weakly positive for EB13. This specific distribution further indicates that both macrophages and dendritic cells are involved in EB13 production. The staining within the crypts was also observed with the control antibodies and is therefore considered to be non-specific. (d–g) Serial section analysis of appendix mucosa from a CD patient with anti-CD68 antibody (d), anti-EB13 antibody (e), rabbit anti-p28 antibodies (f), and control rabbit antibodies (g). A cluster of CD68-positive macrophages is labelled with both anti-EB13 and anti-p28 antibodies. Plasma cells (arrows) are also stained with anti-EB13 and anti-p28 antibodies. (h–j) Serial section analysis of a granuloma from the appendix of a CD patient with anti-EB13 antibodies (h), rabbit anti-p28 antibodies (i), and control rabbit antibodies (j). Epithelioid cells of the granuloma co-express EB13 and p28, whereas infiltrating lymphoid cells are negative. Epithelioid cells were also stained with rat 29B5 anti-p28 antibody (data not shown). Peroxidase technique. Haematoxylin counterstain. Magnification:  $\times 220$  (a, c),  $\times 340$  (b),  $\times 400$  (d–f),  $\times 190$  (g–i). b represents a higher magnification of the serial zone delimited by the frame in a

cytokines and previous observations have suggested that IL-27 action may precede IL-12 action, since IL-27 appears to be expressed earlier after induction [1]. Recent studies have shown that IL-27 plays a critical role in Th1 development by inducing T-bet through Stat1 activation [35,36]. T-bet is a transcription factor that plays an essential role in Th1 development by transactivating IFN- $\gamma$  gene expression and inducing IL-12R $\beta 2$  expression [6]. By inducing T-bet and IL-12R $\beta 2$  in naïve T cells, IL-27 allows these cells to respond to IL-12 and differentiate into Th1 cells. Besides T cells, TCCR is expressed in various cell

populations including macrophages and B cells, and a possible role for IL-27 in these cell populations in the development of a granulomatous response remains to be determined.

Cells of the macrophage lineage, sinus and tissue macrophages, as well as epithelioid and multinucleate giant cells of granulomas, were among the principal cells co-expressing both subunits of IL-27 in the tissues analysed. This observation is consistent with previous *in vitro* analysis, showing that both IL-27 genes are co-expressed in LPS-activated monocytes [1]. To date, the only data regarding EB13 and p28

co-expression have been obtained by quantitative PCR analysis of IL-27 gene expression in primary cell cultures and tissues. That study revealed that EBI3 has a broader expression profile than p28. EBI3 was found to be expressed at high levels in LPS-activated monocytes and monocyte-derived dendritic cells, but also, albeit at lower levels, in activated endothelial cells, splenocytes, and various T-cell subsets. In contrast, p28 expression was largely restricted to LPS-activated monocytes and monocyte-derived dendritic cells [1]. Also consistent with that report and other *in vitro* or *in vivo* studies [37–39], strong EBI3 expression was observed *in vivo* in dendritic cells. However, although monocyte-derived dendritic cells generated *in vitro* co-express p28 and EBI3 mRNAs and secrete IL-27 protein [1], we were unable to detect p28 expression in EBI3-positive dendritic cells in the various tissues analysed. This failure to detect p28 was unlikely to be due to a lack of reactivity of our antibodies for dendritic cell-derived p28, since these antibodies detect IL-27 in the supernatant of *in vitro* activated dendritic cells (unpublished observations). Study of the kinetics of EBI3 and p28 mRNA expression in human dendritic cells activated *in vitro* showed that p28 expression is very transient, whereas EBI3 expression is more sustained. This transient p28 gene expression may result in very low amounts of intracellular p28 protein, below the sensitivity of our immunohistochemistry technique.

In addition to myeloid cells, EBI3 production was detected in endothelial cells. This observation is in line with the low level of EBI3 transcripts present in activated endothelial cells [1]. Interestingly, these cells co-expressed p28. Similarly, plasma cells co-expressed both subunits of IL-27. These data indicate that EBI3 and p28 co-expression is not restricted to antigen-presenting cells, but can be observed in other cell types. Of note, not all endothelial cells expressed EBI3 and p28, as shown by their variable reactivity with EBI3 and p28 antibodies observed in this study and the lack of EBI3 detection in endothelial cells of placental villi [31]. This suggests that IL-27 is expressed only by activated endothelial cells in inflammatory tissues, thereby contributing to the local inflammation.

An earlier study of EBI3 expression in human intestine indicated that EBI3 mRNA is present at low levels in normal bowel and bowel from CD patients and significantly up-regulated in colonic specimens from patients with active ulcerative colitis. Macrophages and/or dendritic cells dispersed throughout the lamina propria accounted for its production [40]. Expression of EBI3 in CD granulomas and expression of p28 were not examined. Here, we have shown that EBI3 and p28 are co-expressed in granulomas infiltrating the intestinal wall or the mesenteric lymph nodes of CD patients. In the lamina propria of both controls and CD patients, we detected variable numbers of EBI3-positive cells, mainly dendritic cells and macrophages but also plasma cells, the latter two populations also expressing p28. The limited number of cases analysed

did not allow a quantitative study and additional analyses will be needed to determine the relative expression of EBI3 and IL-27 in normal mucosa, CD or other inflammatory bowel diseases. In CD, increased expression of Th1 cytokines is associated with increased expression of T-bet by lamina propria T cells [41]. The local expression of IL-27 that we observed in the mucosa may therefore be involved in T-bet induction in these cells and their polarization into Th1 cells.

This study provides the first evidence that Th1-associated granulomatous diseases are characterized by significant production of IL-27 within granulomas. Further *in situ* analyses of IL-27 expression in a larger spectrum of pathological conditions will be required to determine the exact contribution of this novel cytokine to the different types of immune response.

### Acknowledgements

We thank Laurence Brégeaud and Monique Perennec (Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Necker) for excellent technical assistance. FL is supported by a fellowship from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris.

### References

- Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naïve CD4(+) T cells. *Immunity* 2002; **16**: 779–790.
- Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol* 2003; **3**: 133–146.
- Devergne O, Hummel M, Koeppen H, et al. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein–Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* 1996; **70**: 1143–1153.
- Chen Q, Ghilardi N, Wang H, et al. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 2000; **407**: 916–920.
- Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, et al. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity* 2001; **15**: 569–578.
- Robinson DS, O'Garra A. Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* 2002; **16**: 755–758.
- Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 581–620.
- Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996; **64**: 1351–1356.
- Bergeron A, Bonay M, Kambouchner M, et al. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations with histopathologic features of the granulomatous response. *J Immunol* 1997; **159**: 3034–3043.
- Zhang M, Gong J, Presky DH, Xue W, Barnes PF. Expression of the IL-12 receptor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 subunits in human tuberculosis. *J Immunol* 1999; **162**: 2441–2447.
- Taha RA, Kotsimbos TC, Song YL, Menzies D, Hamid Q. IFN- $\gamma$  and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**: 1135–1139.
- Taha RA, Minshall EM, Olivenstein R, et al. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **160**: 1119–1123.
- Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 1993; **61**: 3482–3489.
- Zhang M, Gately MK, Wang E, et al. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994; **93**: 1733–1739.

15. Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Samten B, Girard WM, Barnes PF. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; **182**: 234–239.
16. Yamada G, Shijubo N, Shigehara K, Okamura H, Kurimoto M, Abe S. Increased levels of circulating interleukin-18 in patients with advanced tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**: 1786–1789.
17. Devergne O, Emilie D, Peuchmaur M, Crevon MC, D'Agay F, Galanaud P. Production of cytokines in sarcoid lymph nodes: preferential expression of interleukin-1 $\beta$  and interferon- $\gamma$  genes. *Hum Pathol* 1992; **23**: 317–323.
18. Moller DR, Forman JD, Liu MC, *et al.* Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; **156**: 4952–4960.
19. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, *et al.* IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN- $\gamma$  production in sarcoid lungs. *J Immunol* 2001; **166**: 642–649.
20. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Med* 2002; **6**: 567–573.
21. Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002; **50**(Suppl III): iii60–iii64.
22. Fuss JJ, Neurath M, Boirivant M, *et al.* Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 1996; **157**: 1261–1270.
23. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, *et al.* Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997; **150**: 823–832.
24. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, *et al.* Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997; **112**: 1169–1178.
25. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, *et al.* Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; **163**: 143–147.
26. Berrebi D, Besnard M, Fromont-Hankard G, *et al.* Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1998; **152**: 667–672.
27. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, *et al.* IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999; **162**: 6829–6835.
28. Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S, *et al.* Up-regulation of the IL-12 receptor  $\beta$ 2 chain in Crohn's disease. *J Immunol* 2000; **165**: 7234–7239.
29. Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, *et al.* Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; **119**: 1514–1523.
30. Kakazu T, Hara J, Matsumoto T, *et al.* Type 1 T-helper cell predominance in granulomas of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**: 2149–2155.
31. Devergne O, Coulomb-L'Hermine A, Capel F, Moussa M, Capron F. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pathol* 2001; **159**: 1763–1776.
32. Pinkus GS, Pinkus JL, Langhoff E, *et al.* Fascin, a sensitive new marker for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation? *Am J Pathol* 1997; **150**: 543–562.
33. Jaspars EH, Bloemena E, Bonnet P, Scheper RJ, Kaiserling E, Meijer CJ. A new monoclonal antibody (3A5) that recognises a fixative resistant epitope on tissue macrophages and monocytes. *J Clin Pathol* 1994; **47**: 248–252.
34. Pavli P, Maxwell L, Van de Pol E, Doe F. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996; **104**: 124–132.
35. Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, *et al.* Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-Bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 2003; **170**: 4886–4890.
36. Hibbert L, Pflanz S, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. IL-27 and IFN $\alpha$  signal via STAT1 and STAT3 and induce T-Bet and IL-12R $\beta$ 2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 2003; **23**: 513–522.
37. Hashimoto SI, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood* 2000; **96**: 2206–2214.
38. Van Seventer JM, Nagai T, van Seventer GA. Interferon-beta differentially regulates expression of the IL-12 family members p35, p40, p19 and EB13 in activated human dendritic cells. *J Neuroimmunol* 2002; **133**: 60–71.
39. Niedobitek G, Pazolt D, Teichmann M, Devergne O. Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EB13, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 2002; **198**: 310–316.
40. Christ AD, Stevens AC, Koeppen H, *et al.* An interleukin 12-related cytokine is up-regulated in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; **115**: 307–313.
41. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, *et al.* The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002; **195**: 1129–1143.



# **PARTIE II**

**EBI3, IL-27 et lymphomes associés aux virus transformants**

**EBV et HTLV-1**

**Article :**

Analysis of interleukin-27 (EBI3/p28) expression in Epstein-Barr virus- and human T-cell leukemia virus type 1- associated lymphomas : heterogeneous expression of EBI3 subunit by tumoral cells.

Frédérique Larousserie, Emilie Bardel, Stefan Pflanz, Bertrand Arnulf, Carmen Lome-Maldonado, Olivier Hermine, Laurence Brégeaud, Monique Perennec, Nicole Brousse, Rob Kastelein, Odile Devergne.

The American Journal of Pathology 2005, 166 :1217-1228

Les travaux antérieurs de l'équipe avaient montré qu'EBI3 est fortement exprimée dans les lignées B infectées *in vitro* par l'EBV, et que son expression est induite *in vitro* par la protéine virale oncogénique LMP1, de façon dépendante de l'activation de NF-κB (Devergne, J Virol 1996 ; Devergne, J Virol 1998). Dans une étude réalisée en collaboration avec G. Niedobitek (Université d'Erlangen, Allemagne), l'équipe avait également montré l'absence d'expression d'EBI3 dans les lymphomes de Burkitt EBV<sup>+</sup>, ce qui était en accord avec l'absence d'expression de LMP1 dans ces tumeurs. En revanche, EBI3 était fortement exprimée *in situ* par les cellules tumorales dans la majorité des lymphomes de Hodgkin étudiés, quel que soit leur statut EBV. Une forte expression d'EBI3 avait également été détectée *in vitro* dans des lignées dérivées de lymphome de Hodgkin (Niedobitek, J Pathol 2002).

Comme les cellules B transformées par l'EBV, les cellules T transformées par l'HTLV-1 ont un haut niveau d'activation constitutive de NF-κB. Ce haut niveau d'activation de NF-κB serait initialement lié à l'expression de la protéine oncogénique virale Tax, puis à d'autres évènements oncogéniques.

Suite à l'identification de l'IL-27, nous avons recherché si la sous-unité p28 était exprimée dans les lymphomes dans lesquels une expression d'EBI3 avait été mise en évidence, à savoir les lymphomes de Hodgkin. En parallèle, nous avons analysé l'expression de l'IL-27 dans d'autres formes de lymphomes associés à l'EBV, ainsi que dans les lymphomes associés à l'HTLV-1 (ATL). En effet, en dehors de l'étude de Niedobitek et coll. le profil d'expression d'EBI3 dans les lymphomes n'était pas connu. De même, aucune analyse du profil d'expression de p28 dans des tissus tumoraux n'avait été réalisée

Ainsi, nous avons analysé l'expression d'EBI3 et de p28 *in situ* dans une nouvelle série de lymphomes de Hodgkin associés ou non à l'EBV (n=14) et dans diverses lymphoproliférations associées à l'EBV (n=16) dont des syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation et des lymphomes T/NK de type nasal. En parallèle, nous avons recherché la présence de p28 et de l'IL-27 *in vitro* dans des lignées B transformées par l'EBV et dans des lignées dérivées de lymphome de Hodgkin. Par immunohistochimie, nous avons observé une

forte expression d'EBI3 par les cellules tumorales, non seulement dans les lymphomes de Hodgkin, mais également dans les lymphoproliférations associées à l'EBV exprimant LMP1. Par contre, p28 n'était que rarement détectée *in situ* dans les cellules tumorales dans la quasi totalité des cas. Parallèlement, nous n'avons pas détecté p28 dans les lysats cellulaires de lignées dérivées de lymphomes de Hodgkin ou de lignées transformées par l'EBV, ni de production significative d'IL-27 dans leurs surnageants de culture, alors qu'EBI3 était détectée dans ces deux situations.

L'analyse de l'expression de l'IL-27, *in vitro* et *in situ*, dans l'ATL a montré des résultats comparables : nous avons observé une expression d'EBI3 par les cellules tumorales, en la quasi absence d'expression détectable de p28. Ainsi, nous avons observé que les lignées infectées par l'HTLV-1, HUT-102 et MT-2, ainsi que les cellules leucémiques de patients atteints d'ATL cultivées en présence de PHA et d'IL-2, expriment fortement EBI3, mais ne secrètent pas de quantité détectable d'IL-27 dans le surnageant de culture. Nous avons montré que l'expression d'EBI3 dans les lignées HTLV-1<sup>+</sup> est dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B : la présence de l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B BAY11-7082 dans le milieu de culture diminue de façon dose-dépendante l'expression constitutive d'EBI3 dans la lignée HUT-102. De plus, nous avons montré que l'oncogène Tax induit l'expression d'EBI3 via l'activation de NF- $\kappa$ B. En effet, l'expression d'EBI3 est induite dans la lignée Jurkat (lignée T HTLV-1<sup>-</sup>) par l'expression, par transfection transitoire, de la protéine Tax sauvage mais pas par un mutant de Tax déficient pour l'activation de NF- $\kappa$ B, le mutant M22. L'étude *in situ* de l'expression des deux sous-unités de l'IL-27 dans une série d'ATL (n=19) a montré l'expression d'EBI3 par les cellules tumorales dans un certain nombre de cas, sans détection de p28 dans ces cellules, en accord avec nos résultats *in vitro*. L'expression d'EBI3 par les cellules tumorales était extrêmement hétérogène, les cas les plus positifs (plus de 30% de cellules tumorales marquées) étant observés dans les formes leucémiques et non dans les formes lymphomes. Afin d'évaluer la spécificité de l'expression d'EBI3 dans l'ATL, nous avons analysé en parallèle son expression dans des lymphomes T non associés à l'HTLV-1 ni à l'EBV (lymphomes T périphériques, lymphomes anaplasiques à grandes cellules, mycosis fungoïdes et lymphomes de type lymphadénite angio-immunoblastique, n=16). Dans ces

lymphomes, l'expression d'EBI3 par les cellules tumorales était nulle ou rare (1-5% de cellules tumorales positives dans 3 cas). De plus, par double marquage, nous avons montré que les cellules T normales des ganglions hyperplasiques non tumoraux ainsi que les lymphocytes T réactionnels infiltrant les lymphomes, n'expriment pas EBI3. L'ensemble de ces résultats indique que l'expression d'EBI3 par les lymphocytes T tumoraux d'ATL, bien qu'hétérogène, est spécifique.

Cette étude a permis de préciser le profil d'expression d'EBI3 *in situ* dans les lymphomes, et de montrer qu'une forte expression d'EBI3 par les cellules tumorales est observée, non seulement dans les lymphomes de Hodgkin, mais également dans des lymphomes associés à l'EBV exprimant la protéine de latence virale LMP-1 et dans les ATL. Dans la majorité des cas, nous détectons des quantités nulles ou très faibles de p28 dans les cellules tumorales, aussi bien *in situ* qu'*in vitro*, ce qui suggère un rôle d'EBI3 indépendamment de son association à p28.

Tumorigenesis and Neoplastic Progression

# Analysis of Interleukin-27 (EBI3/p28) Expression in Epstein-Barr Virus- and Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Lymphomas

## *Heterogeneous Expression of EBI3 Subunit by Tumoral Cells*

Frédérique Larousserie,<sup>\*†</sup> Emilie Bardel,<sup>\*</sup>  
Stefan Pflanz,<sup>‡</sup> Bertrand Arnulf,<sup>§</sup>  
Carmen Lome-Maldonado,<sup>¶</sup> Olivier Hermine,<sup>\*</sup>  
Laurence Brégeaud,<sup>†</sup> Monique Perennec,<sup>†</sup>  
Nicole Brousse,<sup>†</sup> Rob Kastelein,<sup>‡</sup> and  
Odile Devergne<sup>\*</sup>

From the CNRS UMR 8147,<sup>\*</sup> Université Paris V, Institut Fédératif de Recherche Necker, Paris, France; Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur EA 219,<sup>†</sup> Service d'Anatomie Pathologique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France; the Service d'Immuno-Hématologie,<sup>§</sup> Hôpital St. Louis, Paris, France; DNAX Research Institute,<sup>‡</sup> Palo Alto, California; and the Department of Pathology,<sup>¶</sup> Instituto Nacional de Ciencias Medicas Y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico

**Interleukin (IL)-27 is a novel heterodimeric cytokine of the IL-12 family that is composed of two subunits, Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene 3 (EBI3) and p28. EBI3 is expressed at high levels in EBV-transformed B-cell lines and is induced *in vitro* by the EBV oncogene LMP1 in a nuclear factor (NF)- $\kappa$ B-dependent manner. We show here that EBI3 expression is up-regulated in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected cell lines and IL-2-dependent leukemic cells from adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) patients, compared to normal activated T cells. EBI3 expression was decreased in HTLV-1-transformed cells after treatment with the NF- $\kappa$ B inhibitor BAY11-7082 and was induced in Jurkat cells by expression of HTLV-1 wild-type Tax oncoprotein, but not by the Tax mutant M22, which is defective for NF- $\kappa$ B activation. *In situ* analysis of EBI3 and p28 expression in Hodgkin's lymphomas (HLs), in various EBV-associated lymphoproliferative disorders (LPDs) (including post-transplant LPDs and nasal-type NK/T-cell lymphomas), and in ATL showed that EBI3 was expressed**

**by neoplastic cells in all cases of HL and of LMP1-positive EBV-associated LPD, at variable levels in ATL cases, but rarely in control T-cell lymphomas. In contrast, in all lymphomas tested, no or few tumoral cells expressed p28. Consistent with these data, no significant p28 or IL-27 expression was detected in HL-derived cell lines, or in EBV- or HTLV-1-transformed cell lines. This selective overexpression of EBI3 by transformed cells suggests that EBI3 may play a role, independently from its association to p28, in regulating anti-viral or anti-tumoral immune responses. (Am J Pathol 2005, 166:1217-1228)**

In humans, two transforming viruses, Epstein-Barr virus (EBV) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), are causally associated with the development of lymphomas. EBV, a human  $\gamma$ -herpesvirus, efficiently transforms primary B cells, *in vitro*, into continuously growing lymphoblastoid cell lines (LCLs), and has been closely associated with the development of several lymphoid malignancies, including endemic Burkitt's lymphoma (BL), Hodgkin's lymphoma (HL), and lymphoproliferative disorders (LPDs) arising in immunocompromised individuals.<sup>1,2</sup> HTLV-1 is a retrovirus and is the etiological agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), an aggressive malignancy of mature CD4-positive T lymphocytes.<sup>3</sup>

Previously, we reported the characterization of a novel EBV-induced gene, *EBI3*.<sup>4</sup> *EBI3* was cloned by subtractive hybridization from an EBV-infected BL cell line and

---

Supported by the Association de Recherche Contre le Cancer (grants no. 4416 and 7711 to O.D.) and CNRS/Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (fellowship to F.L.).

Accepted for publication December 21, 2004.

Present address of S.P.: Micromet AG, München, Germany.

Address reprint requests to Odile Devergne, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Bâtiment Sèvres, 161 rue de Sèvres, 75 015 Paris, France. E-mail: devergne@necker.fr.

was found to be highly expressed in LCLs. It codes for a soluble type 1 cytokine receptor, homologous to the p40 subunit of interleukin (IL)-12. Recently, EB13 has been shown to associate with a new IL-12 p35-related subunit, p28, to form a novel noncovalently linked heterodimeric cytokine (EB13/p28), named IL-27.<sup>5</sup> The receptor complex for IL-27 is composed of TCCR (also called WSX-1 or IL-27R) and gp130.<sup>5,6</sup> Initial studies have suggested that IL-27 may play an important role in initiation of Th1 responses. This role was based on: 1) the *in vitro* expression profile of EB13 and p28, as defined by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis, showing that co-expression of EB13 and p28 was mainly observed in activated macrophages and dendritic cells;<sup>5</sup> 2) the ability of IL-27 to induce T-bet and IL-12R $\beta$ 2 expression in naive CD4-positive T cells,<sup>7-9</sup> to stimulate their proliferation, and to synergize with IL-12 for interferon- $\gamma$  production<sup>5,7</sup>; 3) the phenotype of IL-27R-deficient mice showing a defect in Th1 response initiation on infection with *Listeria monocytogenes* or *Leishmania major*.<sup>10,11</sup> Consistent with this model, we observed that EB13 and p28 were co-expressed by macrophages and macrophage-derived cells at the site of disease in human Th1-associated granulomatous diseases.<sup>12</sup> However, subsequent studies led to reconsider this model and a possible role of IL-27 as a suppressor of T-cell activation has emerged.<sup>13</sup> Indeed, two recent studies showed that IL-27R-deficient mice were capable of mounting a Th1 response to infection by *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*, but exhibited increased mortality because of dysregulated T-cell activation and hyperproduction of proinflammatory cytokines.<sup>14,15</sup> Taken together, these findings have suggested that IL-27 functions may be complex, and that IL-27 may, depending on the context, function either as a Th1 response co-inducer or as a negative regulator of T-cell and inflammatory responses.

Previously we showed that EB13 is induced *in vitro* by the EBV oncogene LMP1, and that its induction by LMP1 depends on nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation.<sup>4,16</sup> LMP1 is one of the nine EBV-encoded proteins expressed in latently infected B cells and plays a key role in EBV-mediated growth transformation.<sup>17</sup> LMP1 is also expressed *in vivo* in many EBV-associated LPDs, including HL, post-transplant LPD, and nasal type NK/T-cell lymphoma. In a previous study, we found that EB13 was not expressed in EBV-positive BL, consistent with the absence of LMP1 expression in this type of lymphoma, but was expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) tumoral cells in most cases of HL.<sup>18</sup> The expression of EB13 in other lymphomas has not been reported. The expression profile of p28 in tumor tissues has also not been investigated.

Activation of the NF- $\kappa$ B pathway is a common feature of transforming virus.<sup>19</sup> Indeed, activation of NF- $\kappa$ B by viral proteins leads to transactivation of numerous cellular genes, including cytokines, involved in cell survival and evasion of immune response. Thus, similar to EBV-transformed B cells, HTLV-1-transformed T cells exhibit high constitutive NF- $\kappa$ B activity.<sup>20,21</sup> The HTLV-1 Tax oncoprotein plays an important role in T-cell transformation

through its ability to induce constitutive NF- $\kappa$ B activation and to dysregulate cellular gene expression.

To investigate the potential role of IL-27 in viral lymphomagenesis, we further analyzed the expression of both subunits of IL-27 in EBV-associated lymphoid malignancies and extended our study to ATL. Both *in situ* and *in vitro* analyses indicated that EB13, but no or low p28 and IL-27, is expressed by tumoral cells. This dissociated expression of EB13 and p28 suggests that EB13 may play a role, independently from its association with p28, to regulate anti-viral and anti-tumoral responses.

## Materials and Methods

### Primary Cell Culture, Cell Lines, and Transfection

KMH2, L428, and HDLM2 are EBV-negative cell lines derived from HL patients with nodular sclerosis (L428 and HDLM2) or mixed cellularity (KMH2) subtype. NC-37 is an EBV-positive BL cell line. IB4 and LCL-1, -2, -3, -4 (gift from Ellen Cahir-McFarland, Harvard Medical School, Boston, MA) are *in vitro* EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. Jurkat, MOLT-4, and CEM are HTLV-1-negative T-cell lines. MT-2 and HUT-102 are Tax-positive HTLV-1-infected T-cell lines. ATL1 and ATL2 are IL-2-dependent leukemic cells derived from two different patients with acute ATL. All cell lines were maintained in RPMI 1640-Glutamax media (Invitrogen Corp.) supplemented with 10 to 20% fetal bovine serum and antibiotics. Media for leukemic cells was further supplemented with IL-2 (20 U/ml; Roche Diagnostics). To analyze fresh leukemic cells, peripheral blood mononuclear cells from five patients diagnosed with either acute ( $n = 4$ ) or chronic ( $n = 1$ ) ATL were purified by Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences) gradient centrifugation. Samples analyzed contained >70% of leukemic cells. For two of these ATL patients, tissue biopsies were available and were studied by immunohistochemistry for IL-27 expression (cases 23 and 26 in Table 3). CD3-positive T cells, CD4-positive or CD8-positive T-cell subsets were isolated from peripheral blood mononuclear cells from HTLV-1-negative donors by negative selection using magnetic beads (Miltenyi Biotec). Purity was >99.5% for CD3-positive cell selection, >97.5% for CD4-positive cell selection, and >94% for CD8-positive cell selection, as assessed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis and/or immunocytostaining. All blood samples were obtained after informed consent. Purified T cells and T-cell subsets were cultured in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine, and antibiotics and were stimulated for various times with phytohemagglutinin (4  $\mu$ g/ml, Roche Diagnostics) and IL-2 (20 U/ml). BAY11-7082 was purchased from Calbiochem and reconstituted in dimethyl sulfoxide. Jurkat cells ( $5 \times 10^6$  cells per transfection) were transfected with pJFE control plasmid or pJFE plasmid encoding wild-type Tax or M22 mutant (gift from Françoise Bex, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium) by electroporation with a Bio-Rad Gene Pulser Xcell electroporation system at 250 V

and 500  $\mu$ F at room temperature in 200  $\mu$ l of Optimem media (Gibco BRL) containing DNA.

### Tissues

Most tissues analyzed were retrieved from the files of the Department of Pathology of Necker Hospital. Lymphomas were classified according to the World Health Organization classification. We studied paraffin-embedded tissues from 14 cases of HL (7 nodular sclerosis cases, 2 lymphocyte depletion cases, 2 mixed cellularity cases, 1 unclassified case, and 2 nodular lymphocyte predominant cases), 16 cases of EBV-associated LPD (12 cases of B- or T-cell LPD, 10 of which from transplanted patients; 1 case of lymphomatoid granulomatosis; and 3 cases of NK/T-cell lymphoma, nasal type), 19 cases of ATL (12 cases of leukemic form and 7 cases of lymphomatous form), and 16 cases of control T-cell lymphomas (2 cases of angioimmunoblastic T-cell lymphoma; 6 cases of peripheral T-cell lymphoma, unspecified; 4 cases of anaplastic large cell lymphoma; and 4 cases of mycosis fungoides). All cases of HL- and of EBV-associated LPD were tested for LMP1 expression by immunohistochemistry, and when negative were further tested for EBVs by *in situ* hybridization to determine their EBV status. Among HLs, eight cases were negative for EBV (LMP1- and EBV-), and six cases were EBV-positive (LMP1+). Among EBV-associated LPDs, 13 cases were LMP1+, and 3 cases were LMP1- but EBV+. Diagnosis of ATL was made based on previously proposed criteria,<sup>22</sup> including clinical and biological features, the presence of anti-HTLV-1 antibodies in the serum, and the detection of HTLV-1 genome in DNA of leukemic cells. ATL patients originated from West Africa, French Guiana, and French West Indies. Seven cases of nonneoplastic lymph nodes exhibiting follicular hyperplasia of unknown origin were included as controls. All tissues analyzed were collected for histological examination and diagnosis purposes. Therefore, this study complies with the French ethical law for studies on human tissues.

### Immunostaining

Immunostaining was performed on either paraffin-embedded tissue sections or acetone/methanol (1:1)-fixed cytospin preparation. For immunostaining on cytospin preparation, slides were rehydrated in Tris-buffered saline and saturated by incubation with Tris-buffered saline containing 20% normal human serum or 5% human veinglobulins for 30 minutes. They were then incubated with the primary antibody diluted in Tris-buffered saline-0.3% bovine serum albumin for 1 hour. Binding of primary antibodies was detected using peroxidase-conjugated EnVision+ reagent (DakoCytomation). The peroxidase reaction was developed with 3'-diaminobenzidine and slides were counterstained with Harris hematoxylin. Immunostaining of paraffin sections was performed as previously described,<sup>12</sup> by an indirect avidin-biotin peroxidase technique using ChemMate detection reagents (DakoCytomation). In double-immunostaining experi-

ments, binding of the primary antibody in the first label was detected using peroxidase-conjugated EnVision+ reagent and diaminobenzidine (DakoCytomation) as a chromogenic substrate. Binding of the primary antibody in the second label was detected using an indirect avidin-biotin-alkaline phosphatase kit (BioGenex) and Fast blue (Sigma) as a chromogene, and slides were counterstained with methyl green. To ensure the absence of cross-reactivity between the first and second labeling steps, primary antibody was omitted or isotype-matched control antibody was used in the second label.

EBI3 was detected using 2G4H6 mouse monoclonal antibody (mAb) (IgG2a)<sup>23</sup> at 2  $\mu$ g/ml, in parallel with an isotype-matched control mAb (RPC5, IgG2a; Cappel Durham). p28 was detected using affinity-purified rabbit polyclonal anti-p28 antibodies (DNAX)<sup>12</sup> at 1 to 3  $\mu$ g/ml and normal rabbit IgG (Sigma) were used as a negative control. In some experiments, rat anti-p28 29B5 mAb (DNAX)<sup>12</sup> was used at 10  $\mu$ g/ml, in parallel to normal rat IgG (Sigma) as a negative control. LMP1 was detected using CS1 to CS4 mouse mAbs (DakoCytomation) at 4  $\mu$ g/ml. CD3 mAb (clone F7.2.38) and CD8 mAb (clone C8/144B), both from DakoCytomation, were used at 10  $\mu$ g/ml and 0.25  $\mu$ g/ml, respectively. CD25 mAb (clone 4C9; Novocastra Laboratories Ltd.) was used at a 1:100 dilution. For immunocytochemistry, the following antibodies were used: CD3 mAb (clone UCHT1, DakoCytomation) at 1.5  $\mu$ g/ml, CD4 mAb (clone SK3; BD Biosciences) at 0.15  $\mu$ g/ml, and CD8 mAb (clone DK25, DakoCytomation) at 0.25  $\mu$ g/ml. The detection of EBVs was performed by *in situ* hybridization using EBV PNA probe and the PNA *in situ* hybridization detection system (DakoCytomation).

### Western Blot Analysis and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Cells were washed in cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed for 1 hour on ice in lysis buffer (1% Nonidet P-40, 50 mmol/L Tris, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 3% glycerol, 1.5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid) supplemented with protease inhibitors (1 mmol/L phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin). Cell lysates were centrifuged for 15 minutes at 13,000  $\times$  g to remove cell debris and protein concentration was determined using the bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce). Lysates were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose for immunoblotting with anti-EBI3 2G4H6 mAb, mouse anti-Tax mAb (provided by John Brady, NCI, NIH, Bethesda, MD), or rat anti-p28 mAbs (clones 29B5 or 18C5, DNAX). Binding of mouse or rat mAbs was detected with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse antibodies (Amersham Biosciences) or horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat antibodies (Santa Cruz), respectively. Peroxidase reaction was developed with chemiluminescence reagents (Pierce). EBI3 and IL-27 ELISA were previously described.<sup>5,23</sup> EBI3 ELISA detects both free EBI3 and IL-27 (detection limit, 1 ng/ml), whereas IL-27 ELISA is specific for EBI3/p28 heterodimer (detection limit, 0.3

**Table 1.** Immunohistochemical Analysis of IL-27 Expression in HL

Case no.	Diagnosis	Site	LMP1 status	% of EB13+ HRS cells	% of p28+ HRS cells
1	NS	Lymph node	pos	++++	–
2	NS	Lymph node	pos	++++	+
3	NS	Lymph node	neg	++++	–
4	NS	Lymph node	neg	++++	+
5	NS	Lymph node	neg	++++	+
6	NS	Mediastinum	neg	++++	–
7	NS	Mediastinum	neg	++++	–
8	LD	Lymph node	pos	++++	+
9	LD	Lymph node	neg	++++	–
10	MC	Lymph node	pos	++++	–
11	MC	Lymph node	pos	++++	+
12	uc	Lymph node	pos	++++	–
13	NLP	Lymph node	neg	++++	–
14	NLP	Lymph node	neg	++++	–

NS, nodular sclerosis; LD, lymphocyte depletion; MC, mixed cellularity; uc, unclassified; NLP, nodular lymphocyte predominant.  
 –, virtually all cells negative; +, 1 to 5% positive cells; +++, >90% positive cells.

ng/ml). For ELISA, cells (5 to 10 × 10<sup>5</sup> per ml) were grown in RPMI 1640 complete media or in RPMI 1640 media supplemented with 1% Nutridoma (Roche Diagnostics) for 24 to 48 hours. Supernatants were then collected, spun to remove debris, and stored at –80°C. In some experiments, cell culture supernatants were concentrated using Centriprep 10 (Millipore) or Ultrafree-4 centrifugal filter unit (Millipore), before being tested by ELISA.

### Cell Surface Immunofluorescence and FACS Analysis

Cells were washed in FACS buffer (PBS, 2% fetal bovine serum, 0.01% sodium azide), and incubated for 30 minutes on ice with isotype control (MOPC 141, IgG2b; Sigma) or anti-IL-27R mAb (anti-TCCR, IgG2b; R&D Systems) at 10 µg/ml in FACS buffer. Binding of mouse antibodies was detected using phycoerythrin-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG (Coulter) and a minimum of 5000 gated cells were analyzed on a FACS-can. In binding assays, cells were washed in FACS buffer, and incubated with recombinant Flag-tagged IL-27 (DNAX) for 1 hour at 1 µg/ml in FACS buffer followed by incubation with M2 anti-Flag antibody (Sigma), and goat anti-mouse IgG as above. As a control, Flag-tagged IL-27 was omitted in the first step. Anti-TCCR mAb was first verified to detect cell surface IL-27R by transfection of COS7 cells with an expression vector coding for human IL-27R (gift from Hugues Gascan's laboratory, Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale U564, Angers, France).

## Results

### Immunohistochemical Analysis of IL-27 Expression in HL and Other EBV-Associated LPDs

To further investigate the expression of EB13 and IL-27 in EBV-associated lymphoid neoplasia, 14 cases of HL (6

EBV+ and 8 EBV–) and 16 cases of various EBV-associated LPDs were analyzed by immunohistochemistry for expression of the two subunits of IL-27, EB13 and p28, in parallel to LMP1 expression (Tables 1 and 2, and Figure 1).

Consistent with previous work,<sup>18</sup> EB13 was expressed by HRS cells in all cases of HL, independently of LMP1 expression and of the histological subtype (Table 1). In each case, the percentage of EB13-positive HRS cells was >90%, with nearly all tumoral cells positive for EB13 in most cases (12 of 14). In contrast, p28 expression by HRS cells was detected in only five cases and in these cases only a minority of HRS cells (ranging from 2 to 5%) was positive for p28 (Table 1). In addition to tumoral cells, variable numbers of cells were positive for EB13. Among these, cells with a morphology consistent with dendritic cells were strongly labeled with EB13, whereas macrophages, endothelial cells, and rare plasma cells showed weak EB13 staining. Macrophages, endothelial cells, plasma cells, as well as fibroblasts, also stained with anti-p28 antibodies (Figure 1, a to d; and data not shown). This staining pattern of nontumoral cells was similar to the one we previously observed in reactive lymph nodes.<sup>12</sup>

Similarly, a dissociated expression of EB13 and p28 by neoplastic cells was observed in the 16 cases of EBV-associated LPD (Table 2). In these cases, expression of EB13 by tumoral cells was heterogeneous, ranging from 0 to >90% of tumoral cells positive for EB13. Interestingly, the percentage of EB13-positive neoplastic cells correlated with that of LMP1-positive cells in most cases. Indeed, in the three LMP1-negative cases, no or few tumoral cells (2% at the most) expressed EB13. In contrast, in all cases positive for LMP1, we always observed EB13 expression by tumoral cells (Figure 1, e and f). Also, heterogeneity of LMP1 expression within a given case was associated with heterogeneity in tumor cell expression of EB13, and we observed an overlapping distribution of EB13- and LMP1-positive tumoral cells. However, although a positive correlation was observed between EB13 and LMP1 expression by tumoral cells, the number of EB13-positive tumoral cells was, in most cases, slightly



**Table 2.** Immunohistochemical Analysis of IL-27 Expression in Various EBV-Associated LPD

Case no.	Diagnosis	Site	% of positive tumoral cells		
			LMP1	EBI3	p28
1	post-transplant B-cell LPD	Lymph node	+++	++++	–
2	post-transplant B-cell LPD	Small Bowel	+ / +++	++++	+++ / +
3	post-transplant B-cell LPD	Retroperitoneum	++	+++	–
4	post-transplant B-cell LPD	Kidney	+++	++++	–
5	post-transplant B-cell LPD	Skin	–	–	ND
6	post-transplant B-cell LPD	Lymph node	++	++++	–
7	post-transplant B-cell LPD	Small bowel	+ + / + + + +	+ + / + + + +	–
8	post-transplant B-cell LPD	Gingiva	–	–	ND
9	post-transplant B-cell LPD	Tonsil	+++	+++	–
10	post-transplant T-cell LPD	Lymph node	+++	+++	–
11	B-cell LPD	Lymph node	++++	++++	–
12	B-cell LPD	Retroperitoneum	++	++++	–
13	Lymphomatoid granulomatosis	Lymph node	+++	++++	–
14	NK/T-cell lymphoma, nasal type	Lymph node	+++	++++	–
15	NK/T-cell lymphoma, nasal-type	Nose	+	++	–
16	NK/T-cell lymphoma, nasal-type	Nose	–	+	ND

–, Virtually all cells negative; +, 1 to 5% positive cells; ++, 10 to 30% positive cells; +++, >30 to 80% positive cells; +++++, >80% positive cells. ND, not done.

LMP1-negative cases were positive for EBV, as assessed by EBER *in situ* hybridization.

In two cases (cases 2 and 7), the percentage of positive cells was highly heterogeneous and the lower and upper values are indicated.

more than that of LMP1-positive cells (Table 2). This may be because of the higher sensitivity of EBI3 detection by immunohistochemistry, compared to that of LMP1. Also, the substantial overexpression of EBI3 compared to LMP1 observed in one case (case 6) suggests that other mechanisms than LMP1 induction may result in EBI3 expression by tumoral cells. Concerning p28, no significant expression by tumor cells was observed in 15 of 16 cases. In only one case (case 2), a significant fraction of tumoral cells expressed p28. In this case, we observed two patterns of staining, corresponding to two different populations of neoplastic cells. One population consisting of large cells showed strong EBI3 reactivity in most cells (>90% positive cells), as well as LMP1 reactivity in a fraction of them, but rarely expressed p28 (~1% positive cells). The second population consisted of smaller cells with a plasmacytic differentiation, many of which were positive for both EBI3 and p28 (>70% positive cells for both subunits), but rarely expressed LMP1 (~1% positive cells) (Figure 1, g and h). Expression of p28 by this specific tumoral cell population may be related to its peculiar stage of differentiation, because normal plasma cells and cells with a plasmacytic differentiation present in follicles of reactive lymph nodes expressed p28 (Ref. 12 and this study). The pattern of EBI3 and p28 staining of nontumoral cells was similar to the one observed in HL.

Taken together, these data indicate that HLs and LMP1-positive LPDs are characterized by strong EBI3 expression by neoplastic cells. In contrast, we failed to detect a significant production of p28 by tumoral cells in most cases.

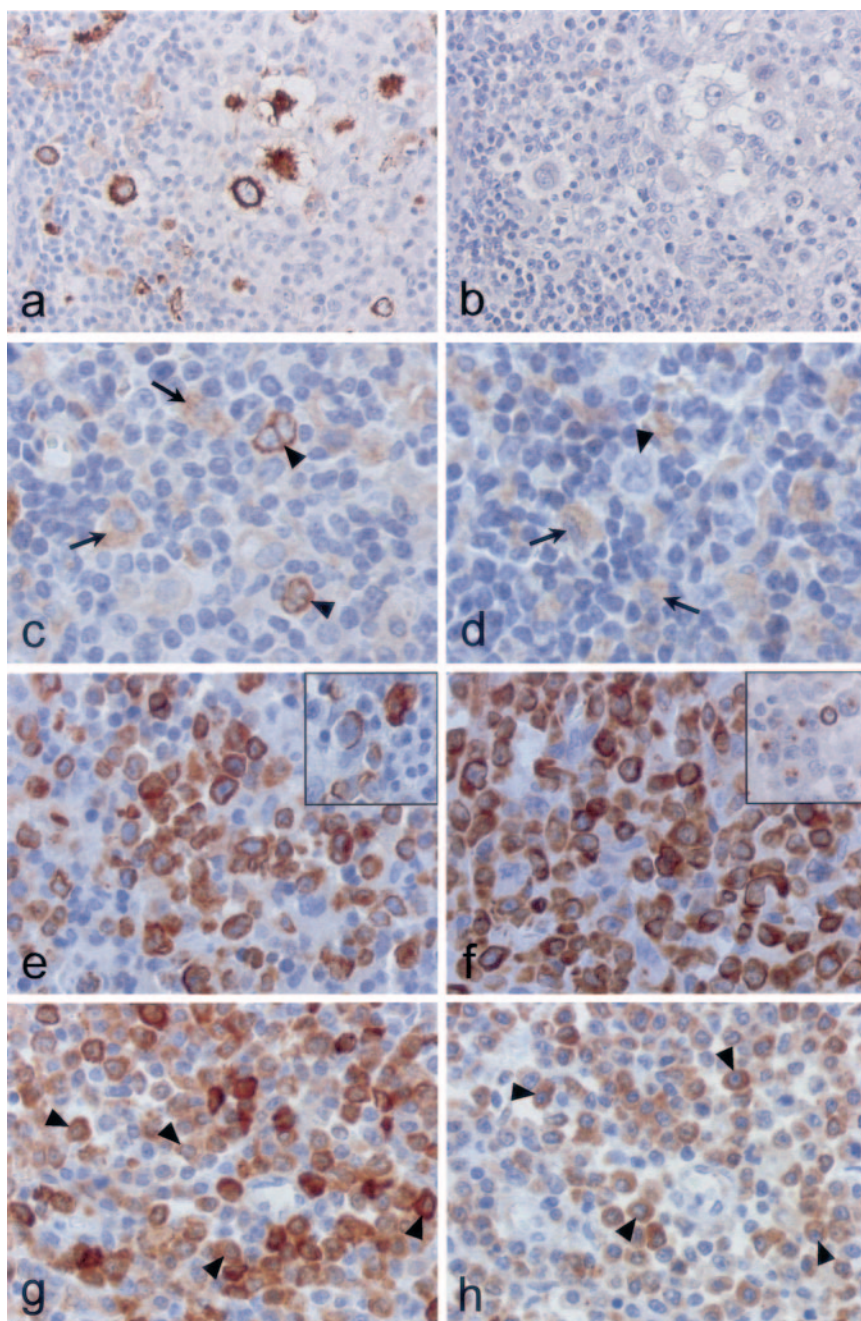
#### Analysis of IL-27 and IL-27R Expression in HL-Derived Cell Lines and LCLs

To further analyze IL-27 expression, three HL-derived cell lines, L428, KMH2, and HDLM2, and four LCLs were tested for IL-27 expression. These cell lines expressed

EBI3 as tested by Western blot analysis of the cell lysate (Ref. 18 and data not shown). By ELISA of the cell culture supernatant, HL-derived cell lines secreted from 1.9 to 35.3 ng/ml of EBI3,<sup>18</sup> and LCLs from 1.3 to 5.7 ng/ml of EBI3. By Western blot, no p28 could be detected in their cell lysates and no p28 induction was observed after LMP1 transient or stable transfection (limit of detection, 0.5 ng per lane) (data not shown). By ELISA, no IL-27 was detected in cell culture supernatants (limit of detection, 0.3 ng/ml), unless they were concentrated by 20-fold to 40-fold. Under these latter conditions, low levels of IL-27 were detected (~1 ng/ml). Consistent with a low level of p28 expression, no signal or a very faint p28 signal was detected by immunocytochemical staining of both HL-derived cell lines and LCLs (data not shown). We next examined whether these cell lines express IL-27R. All seven cell lines expressed IL-27R and bound IL-27, as assessed by FACS analysis (Figure 2). Thus, consistent with the *in situ* analysis, *in vitro* studies indicated that HL-derived cell lines and LCLs express high levels of EBI3, and IL-27R, but only a very low amount, if any, of p28.

#### HTLV-1-Infected T-Cell Lines Constitutively Express EBI3

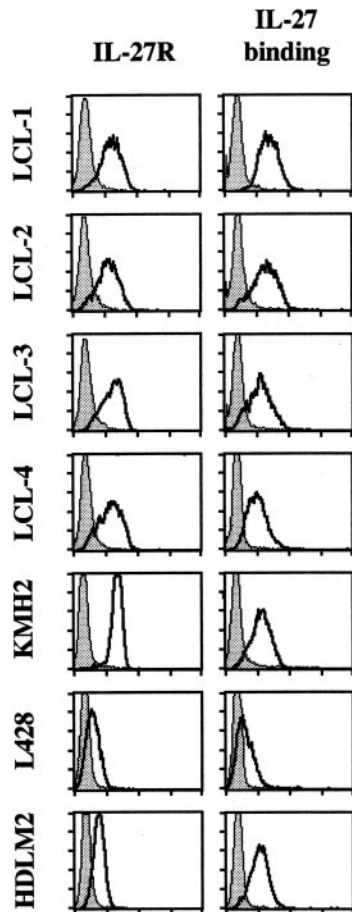
Previous studies in LCLs<sup>16,24</sup> or in mouse B cells<sup>25,26</sup> have shown that EBI3 is a NF- $\kappa$ B-induced gene. Because HTLV-1-positive T cells exhibit high constitutive NF- $\kappa$ B activity,<sup>20,21</sup> we hypothesized that EBI3 may be up-regulated in these cells. To test this hypothesis, two HTLV-1-infected cell lines, HUT-102 and MT2, as well as IL-2-dependent leukemic cells derived from two ATL patients, were tested by Western blot for EBI3 expression. Three HTLV-1-negative T-cell lines, Jurkat, CEM, and MOLT-4, were tested in parallel as negative controls. As shown in Figure 3A, left, no signal was detected in the cell lysates from the three control T-cell lines. In contrast, EBI3 was constitutively expressed in IL-2-dependent leukemic



**Figure 1.** Immunohistochemical analysis of IL-27 expression in HL and various EBV-associated LPDs. **a–d:** Staining of sections from two cases of HL (**a, b:** mixed cellularity; **c, d:** nodular lymphocyte predominant) with anti-EBI3 (**a, c**) or anti-p28 (**b, d**) antibodies, showed that HRS cells express EBI3, but no detectable p28. Of note (**c, d**), macrophages (**arrows**) that exhibit weaker staining than tumoral cells (**arrowhead**) for EBI3 are also stained with anti-p28 antibodies, whereas strongly EBI3-positive tumoral cells remain negative for p28. **e:** Numerous tumoral cells from an LMP1-positive (**inset**) post-transplant B-cell LPD express EBI3. **f:** Similarly, numerous tumoral cells from a nasal type NK/T-cell lymphoma that express LMP1 (**inset**) are strongly labeled with anti-EBI3 antibody. In one case of post-transplant LPD (case 2 in Table 2), a specific population of tumoral cells with a plasmacytic differentiation (**arrowheads**) express both EBI3 (**g**) and p28 (**h**). In all cases, no signal was observed with control antibodies used in parallel (data not shown). Original magnifications:  $\times 20$  (**a, b**);  $\times 40$  (**c–h**). Original zoom factors: 1.1 (**a, b**); 1.3 (**c, d**); 1 (**e–h**).

cells from ATL patients and in the two HTLV-1-infected cell lines (Figure 3A, left). In these latter, EBI3 levels were similar to those observed in two EBV-positive B cell lines, NC37 and IB4 (Figure 3A, right). By ELISA, MT2 and HUT-102 were found to secrete 3.9 and 8 ng/ml of EBI3, respectively, and IL-2-dependent leukemic cells secreted 6.3 and 2.2 ng/ml. These values are in the range of that observed in LCLs. Next, we investigated whether

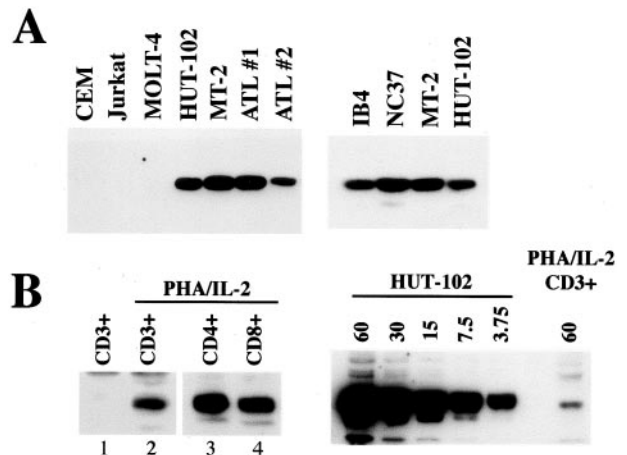
normal primary T cells express EBI3. To this end, CD3-positive T cells were purified from peripheral blood from HTLV-1-negative individuals, and cultured for 2 to 7 days with phytohemagglutinin and IL-2. In unstimulated T cells, no EBI3 could be detected by either Western blot analysis of the cell lysate or immunocytochemical staining (Figure 3B and data not shown). After 2 days of stimulation, weak EBI3 signal could be detected (Figure 3B) and this ex-



**Figure 2.** HL-derived cell lines and LCLs express IL-27R. Four LCLs (LCL-1, -2, -3, -4) and three HL-derived cell lines (KMH2, L428, HDLM2) were tested for IL-27R cell surface expression and IL-27 binding by FACS analysis (x axis, log fluorescence intensity; y axis, cell number) as indicated in Materials and Methods. The filled gray line corresponds to controls.

pression was maintained for up to 7 days (data not shown). Similar experiments performed with purified CD4-positive or CD8-positive T cells indicated that both T-cell subsets expressed EBI3 after stimulation (Figure 3B). However, although EBI3 expression could be detected in normal activated T cells, levels were much lower than those observed in HTLV-1-infected cells (Figure 3C). Indeed, titration experiment showed that EBI3 signal observed in the cell lysate from HUT-102 cells was at least 16-fold higher than that observed in the cell lysate from stimulated normal T cells. Consistent with this low level of intracellular EBI3 in stimulated normal T cells, no EBI3 could be detected in neat cell culture supernatants by ELISA, and levels were just above the limit of detection when supernatants were concentrated by 25-fold. Altogether, these data indicate that EBI3 is specifically up-regulated in HTLV-1-infected cells.

Next, we examined whether normal T cells or HTLV-1-positive T-cell lines expressed IL-27. As observed in HL-derived cell lines and LCLs, no signal or a barely detectable p28 signal was detected by immunocytostaining in HTLV-1-infected cells (HUT-102 and MT-2) or in activated normal T cells (both CD4- and CD8-positive subsets) (data not shown). No IL-27 could be detected in

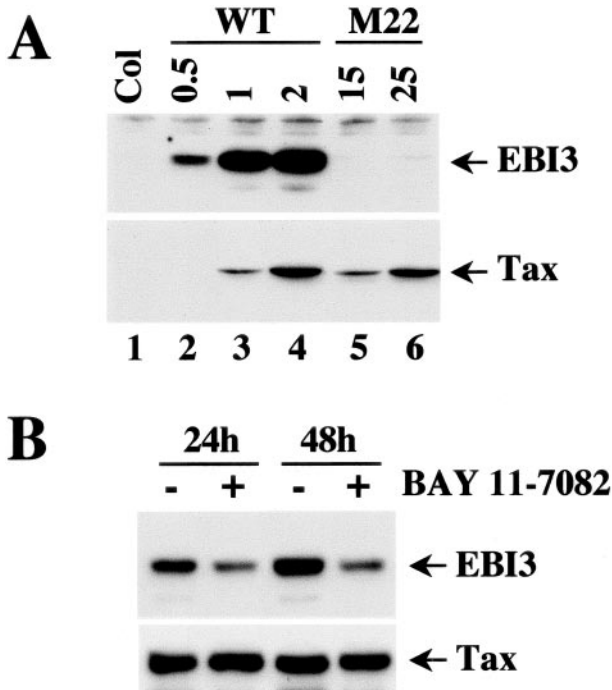


**Figure 3.** Immunoblot analysis of EBI3 expression in HTLV-1-infected cells and normal T cells. **A:** Cell lysates (1% Nonidet P-40 extracts, 10  $\mu$ g per lane) from three HTLV-1-negative T-cell lines (CEM, Jurkat, MOLT-4), two HTLV-1-positive T-cell lines (HUT-102, MT-2), and IL-2-dependent leukemic cells from two ATL patients (ATL 1, ATL 2) (**left**), as well as two EBV-positive B cell lines, IB4 and NC37 (**right**), were analyzed by Western blot with anti-EBI3 antibodies. **B (left):** EBI3 immunoblot analysis of cell lysates (1% Nonidet P-40 extracts, 50  $\mu$ g per lane) from purified CD3-positive T cells (**lanes 1 and 2**), purified CD4-positive T cells (**lane 3**), and purified CD8-positive T cells, either unstimulated (**lane 1**) or stimulated for 40 to 42 hours with phytohemagglutinin and IL-2 (**lanes 2 to 4**) were analyzed by immunoblotting with anti-EBI3 antibodies. The low level of EBI3 expression detected was unlikely due to contaminating cell populations because the numbers of EBI3-positive cells as tested by immunocytostaining (at least 20%) were clearly more than that of contaminating cells (from 0.5 to 6%) (data not shown). **B (right):** The amounts of cell lysates (Nonidet P-40 extracts) indicated at **top** of the blot (in  $\mu$ g) from HUT-102- or phytohemagglutinin/IL-2-activated primary CD3-positive T cells were analyzed by immunoblotting with anti-EBI3 antibodies. In **B**, a more sensitive chemiluminescent substrate was used than in **A**, because of the low level of EBI3 expressed in normal T cells.

the supernatant from HUT-102, even after a 30-fold concentration. Similar to EBV-positive cell lines, HTLV1-positive cell lines (MT-2 and HUT-102) expressed IL-27R, as tested by FACS analysis (data not shown).

### Role of HTLV-1 Tax and NF- $\kappa$ B Activation in EBI3 Expression

Tax is a viral transactivator that has been shown to transactivate the expression of numerous cellular genes, including many cytokine or cytokine receptor genes,<sup>3</sup> in part through its ability to activate NF- $\kappa$ B. To determine whether Tax induces EBI3 expression and to evaluate the role of Tax-induced NF- $\kappa$ B activation, Jurkat cells were transiently transfected with increasing amounts of expression plasmid coding for wild-type Tax or for a mutant of Tax, M22, previously shown to be defective for NF- $\kappa$ B activation,<sup>27</sup> and cell lysates were analyzed for EBI3 by immunoblotting. Transfection of 0.5  $\mu$ g of pJFE-Tax resulted in significant induction of EBI3 (Figure 4B, lane 2), and transfection of 1 and 2  $\mu$ g resulted in higher EBI3 levels (Figure 4B, lanes 3 and 4). In contrast, transfection of 15 or 25  $\mu$ g of pJFE-M22 (Figure 4B, lanes 5 and 6) failed to induced EBI3 expression, although levels of mutant Tax protein were comparable to the ones observed with wild-type Tax protein, as assessed by Tax immunoblot (Figure 4B, compare lanes 3 and 4 to lanes 5



**Figure 4.** Role of Tax and NF- $\kappa$ B activation on EB13 expression by HTLV-1-infected cells. **A:** Jurkat cells were transfected with pJFE control vector (lane 1) or the indicated amount (in  $\mu$ g) of pJFE-Tax (lanes 2 to 4) or pJFE-M22 (lanes 5 and 6). The total amount of plasmid DNA transfected was kept constant in each transfection by addition of pJFE vector. Cells were lysed 22 hours after transfection in Nonidet P-40 lysis buffer and cell lysates ( $10^6$  cells per lane) were analyzed by immunoblotting with anti-EB13 and anti-Tax antibodies. **B:** HUT-102 cells were treated with 5  $\mu$ mol/L BAY 11-7082 (+) or with dimethyl sulfoxide (-). At time indicated at the top of the blot, cells were lysed in Nonidet P-40 lysis buffer and cell lysates (60  $\mu$ g per lane) were analyzed by Western blot for EB13 and Tax expression.

and 6, respectively). By Western blot, we were not able to detect p28 induction by Tax (data not shown).

To further examine to which extent the high constitutive NF- $\kappa$ B activity observed in HTLV-1-transformed cells contributes to the high level of EB13 expression, HUT-102 cells were treated with BAY11-7082, an inhibitor of NF- $\kappa$ B. BAY11-7082 has been previously shown to inhibit NF- $\kappa$ B activation in HUT-102 (effective dose, 5  $\mu$ mol/L),<sup>28</sup> and to down-regulate EB13 expression in LCLs.<sup>24</sup> Incubation of HUT-102 with 5  $\mu$ mol/L BAY11-7082 resulted in a small decrease of EB13 expression after 24 hours, and in a more pronounced decrease at 48 hours, as assessed by Western blot analysis of the cell lysate (Figure 4B). This effect was specific because Tax levels were not affected by BAY11-7082 treatment (Figure 4B). Thus, as observed in EBV-transformed B cells, expression of EB13 in HTLV-1-transformed T cells is dependent on NF- $\kappa$ B activation.

### In Situ Analysis of IL-27 Expression in Involved Tissues from ATL Patients

The observation that EB13 is highly expressed, *in vitro*, in HTLV-1-transformed T cells led us to investigate whether tumoral cells from involved tissues from ATL patients express EB13. Therefore, the *in situ* expression of EB13 was analyzed by immunohistochemistry in 19 tissue

**Table 3.** Immunohistochemical Analysis of IL-27 Expression in Involved Tissues from ATL Patients and Control T-Cell Lymphomas

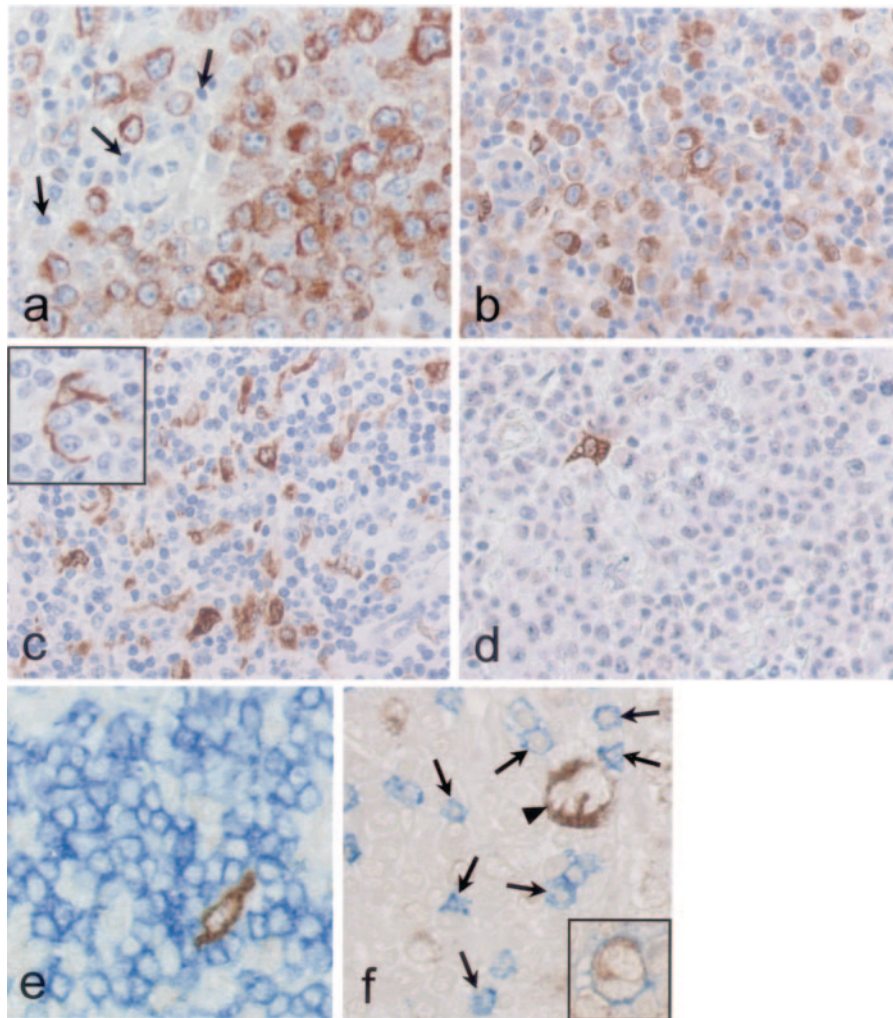
Case no.	Diagnosis	Site	% of positive tumoral cells	
			EB13	p28
<b>Controls</b>				
1	AITL	Lymph node	+	-
2	AITL	Lymph node	-	-
3	PTL	Lymph node	+	-
4	PTL	Lymph node	-	-
5	PTL	Lymph node	-	-
6	PTL	Salivary gland	-	-
7	PTL	Lymph node	-	-
8	PTL	Lymph node	+	-
9	ALCL	Lymph node	-	-
10	ALCL	Lymph node	-	-
11	ALCL	Lymph node	-	-
12	ALCL	Lymph node	-	ND
13	MF	Skin	-	ND
14	MF	Skin	-	ND
15	MF	Skin	-	ND
16	MF	Skin	-	ND
<b>ATL</b>				
17	ATL, leuk	Lymph node	-	-
18	ATL, leuk	Skin	+	+
19	ATL, leuk	Lymph node	-	ND
20	ATL, leuk	Skin	-	-
21	ATL, leuk	Lymph node	++++	+
22	ATL, leuk	Lymph node	+++	NA
23	ATL, leuk	Lymph node	+	-
24	ATL, leuk	Skin	+	-
25	ATL, leuk	Skin	++++	+
26	ATL, leuk	Skin	-	-
27	ATL, leuk	Lymph node	++++	-
28	ATL, leuk	Lymph node	++	NI
29	ATL, lymph	Lymph node	+	ND
30	ATL, lymph	Lymph node	+	ND
31	ATL, lymph	Lymph node	-	ND
32	ATL, lymph	Lymph node	+	-
33	ATL, lymph	Abdomen	+	-
34	ATL, lymph	Lymph node	+	-
35	ATL, lymph	Lymph node	-	-

AITL, angioimmunoblastic T-cell lymphoma; PTL, peripheral T-cell lymphoma, unspecified; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; MF, mycosis fungoides; ATL, adult T-cell lymphoma/leukemia; leuk, leukemic form; lymph, lymphomatous form; ND, not done; NI, not interpretable; NA, not available.

-, Virtually all cells negative; +, 1 to 5% positive cells; ++, 10 to 30% positive cells; +++, >30 to 80% positive cells; +++++, >80% positive cells.

specimens (lymph nodes and skin lesions) from ATL patients, in parallel to p28 expression. As controls, 16 cases of non-HTLV-1-associated mature T-cell lymphomas were analyzed (Table 3 and Figure 5). Among control lymphomas, three cases (cases 2, 3, and 4) were positive for EBER in 0.5 to 3% of tumor cells. However, these cells did not express LMP1.

In control T-cell lymphomas, expression of EB13 by tumoral cells was detected in only three cases (one case of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and two cases of peripheral T-cell lymphomas, unspecified). In these cases, only few tumoral cells (less than 5%) were positive for EB13. Of note, although anaplastic large cell lymphomas share many features with HL, tumoral cells did not express EB13 in the four cases tested (Figure 5d). In ATL cases, EB13-positive neoplastic cells were detected in 13



**Figure 5.** Immunohistochemical analysis of EBI3 expression in ATL. **a–c:** Sections from involved lymph nodes from different ATL patients (all with leukemic form) were stained with anti-EBI3 antibody. **a and b:** Numerous EBI3-positive neoplastic cells are observed. In contrast, reactive lymphocytes (**a, arrows**) infiltrating the tumor are negative. In case shown in **c**, tumoral cells are negative for EBI3, but numerous cells strongly labeled with anti-EBI3 antibodies are observed. Higher magnification (**inset**) shows that these cells have extended cytoplasmic processes and are morphologically consistent with dendritic cells. **d:** EBI3 immunostaining in a case of anaplastic large cell lymphoma shows that tumoral cells are negative for EBI3. Staining of a dendritic-appearing cell is observed. **e:** Double staining for EBI3 (brown) and CD3 (blue) in a nonneoplastic reactive lymph node. Whereas a cell morphologically consistent with a dendritic cell is strongly positive for EBI3 (and CD3-negative), all CD3-positive T cells are negative for EBI3. **f:** Double staining for EBI3 (brown) and CD8 (blue) in an ATL case (same case as in **a**) showed that all reactive CD8+ T cells (**arrows**) surrounding an EBI3+ tumoral cell (**arrowhead**) are negative for EBI3. Tumoral cells were identified based on their morphology and their immunophenotype including the expression of CD25 (**inset**: double staining for EBI3 (brown) and CD25 (blue)). In all cases, no signal was observed with control antibodies used in parallel (data not shown). Original magnifications,  $\times 40$ . Zoom factors: 1 (**a**); 0.8 (**b–d**); 1.3 (**e–f**).

of 19 cases. Their percentage was highly heterogeneous (ranging from 1 to >90% positive tumoral cells) and did not correlate with the site of involvement (lymph node or skin). Interestingly all cases showing the highest scores (five cases ranging from >10 to >90%) were found among patients with leukemic form of ATL (Table 3), whereas patients with lymphomatous form had only low frequency of EBI3-positive tumoral cells (ranging from 1 to 5% in the five of seven cases that contained positive tumoral cells). However, although expressed at low levels in some cases, expression of EBI3 was specific to tumoral T cells, because we did not detect the expression of EBI3 by normal T cells in lymphoid tissues. Indeed, double-staining experiments with anti-EBI3 and anti-CD3 antibodies performed in nonneoplastic lymph nodes ( $n = 7$ ) showed that normal T cells were consistently negative for EBI3 (Figure 5e). In line with these data, reactive

CD8+ lymphocytes infiltrating ATL tumor were negative for EBI3, whereas CD25+ tumoral cells were strongly labeled with anti-EBI3 mAb (Figure 5f). Expression of p28 by neoplastic cells was not detected in the control T-cell lymphomas, and was observed in only three ATL cases. In these latter, less than 5% of tumoral cells were positive for p28. Thus, as observed in HL and other EBV-associated LPD, EBI3 and p28 expression by neoplastic cells was dissociated and characterized by the selective over-expression of EBI3. As previously observed, variable numbers of macrophages and endothelial cells stained with EBI3 and p28 antibodies in both control and ATL cases. In addition, variable numbers of dendritic cells strongly expressing EBI3 were observed. Whereas these cells were usually scarce in the previously analyzed lymphomas, they were abundant in many of the T-cell lymphomas (both control and ATL lymphomas) (Figure 5, c

and d; and data not shown). EB13 expression was also investigated in fresh leukemic cells from patients with acute ( $n = 4$ ) or chronic ( $n = 1$ ) ATL. Surprisingly, although these cells have been reported to exhibit high constitutive NF- $\kappa$ B activation,<sup>20,21</sup> no EB13 expression was detected by either immunoblotting or immunocytochemical staining (data not shown).

## Discussion

This study provides additional information on the *in vivo* expression profile of IL-27 in human pathologies. In a previous study of IL-27 expression in three types of Th1-associated granulomatous diseases, sarcoidosis, tuberculosis, and Crohn's disease, we observed that EB13 and p28 were co-expressed by macrophages and macrophage derived-cells (epithelioid cells and multinucleated giant cells) of granulomas. Also, in both granulomatous diseases and control reactive lymph nodes, sinus macrophages, endothelial cells of postcapillary venules, and plasma cells were found to co-express both subunits of IL-27.<sup>12</sup> Consistent with these data, in all types of lymphomas analyzed, we noticed the presence of variable numbers of macrophages, endothelial cells, and plasma cells that expressed EB13 and p28. Also as previously observed,<sup>12</sup> dendritic cells that infiltrate the tumor expressed EB13, but no detectable levels of p28.

In contrast to the coordinated expression of IL-27 subunits observed within epithelioid granulomas, expression of EB13 and p28 by tumoral cells was dissociated and characterized in many cases by the selective overexpression of EB13. In all cases of HL and of LMP1-positive EBV-associated LPD, as well as a subset of ATL cases, we observed strong EB13 expression by tumoral cells, without significant expression of p28 by these cells. Our failure to detect *in situ* expression of p28 by tumor cells was unlikely to be because of a poor sensitivity of our p28 immunohistochemical technique, because other cell types such as macrophages or endothelial cells were stained with anti-p28 antibodies in the tissues analyzed. Also, in the cell culture supernatant from *in vitro*-cultured HL-derived cell lines and EBV- or HTLV-1-infected cell lines, we were not able to detect significant amounts of IL-27, whereas under the same conditions we could detect IL-27 secretion from supernatant of *in vitro*-derived dendritic cells.<sup>29</sup>

The pattern of EB13 expression observed *in situ* in EBV-associated LPD is consistent with our previous *in vitro* studies, showing that LMP1 induces EB13 expression in B lymphoblasts.<sup>4</sup> In LMP1-negative cases of post-transplant LPD and of nasal-type NK/T-cell lymphoma, no or rare EB13 expression was detected. These data are in line with the absence of tumor cell expression of EB13 observed in endemic BL.<sup>18</sup> In contrast, in all LMP1-positive EBV-associated LPDs, EB13 was expressed by tumoral cells. However, although LMP1 expression was always associated with EB13 expression, we also detected EB13 expression by tumoral cells in the absence of LMP1, as observed in HL (this study and Ref. 18). EB13 is a NF- $\kappa$ B up-regulated gene, and in HRS cells other

mechanisms than LMP1 expression have been proposed to result in constitutive NF- $\kappa$ B activation, including expression and engagement of TNF-R family members such as CD30 or CD40, or activating mutations in molecules of the NF- $\kappa$ B pathway.<sup>30,31</sup> Also, in mouse primary B cells, EB13 has been shown to be induced on activation<sup>25,26</sup> and expression of EB13 by tumoral B cells may be related to their specific stage of activation and differentiation.

Our study also shows that EB13 is overexpressed in HTLV-1-infected T-cell lines and IL-2-dependent leukemic cells from ATL patients, compared to normal activated peripheral T cells. Immunohistochemical analyses showed that EB13 is expressed at variable levels by tumoral cells in involved tissues from ATL patients, but not by normal T cells and very rarely in the control mature T-cell lymphomas analyzed. The factors underlying the heterogeneity of EB13 expression in ATL tissues remain to be determined, but interestingly, the highest levels were found among patients with the leukemic form. *In vitro*, we demonstrated that EB13 expression by HTLV-1-transformed cells is dependent on NF- $\kappa$ B activation, and can be induced by Tax in a NF- $\kappa$ B-dependent manner. The *in situ* activation of NF- $\kappa$ B in lymphomas from ATL patients is not known, and the *in situ* expression of Tax in these lymphomas has been difficult to evidence. Indeed, no or low levels of Tax mRNA have been detected by *in situ* hybridization or reverse transcriptase-polymerase chain reaction/*in situ* hybridization in skin lesions or lymph nodes of ATL patients,<sup>32,33</sup> and the sensitivity of Tax antibody was too low to allow Tax protein detection by immunohistochemistry (F.L., unpublished data).

Although HL and anaplastic large cell lymphoma share common features, including the expression of CD30, no tumoral cell expression of EB13 was observed in the latter. In anaplastic large cell lymphomas, the NPM-ALK oncoprotein has been shown to abrogate CD30-induced NF- $\kappa$ B activation,<sup>34</sup> which may contribute to their lack of EB13 expression. More surprisingly, tumoral T cells from mycosis fungoides also did not express EB13, although constitutive NF- $\kappa$ B activation is assumed to be a characteristic feature of these lymphomas.<sup>35</sup> This suggests that specific NF- $\kappa$ B complexes may be required for induction of EB13. Indeed, studies using mice deficient for specific NF- $\kappa$ B components showed that CD40-mediated EB13 induction in mouse B cells requires specific NF- $\kappa$ B subunits.<sup>26</sup> In the same line, we did not detect EB13 expression in fresh leukemic cells from ATL patients, although these cells exhibit constitutive NF- $\kappa$ B activity. These cells express little or no Tax, and their NF- $\kappa$ B complexes are different from the one observed in Tax-positive HTLV-1-infected cell lines,<sup>20</sup> which may explain the differential expression of EB13 in fresh leukemic cells and HTLV-1-positive cell lines.

The biological significance for the selective expression of EB13 in virus-associated lymphomas remains to be established. LMP1 and Tax are both major targets of specific cytotoxic T lymphocytes and the survival of LMP1- or Tax-positive cells depends on their positive effects on tumoral cell growth and their ability to down-regulate the immune response. Indeed, both proteins

have been shown to play an important role in lymphomagenesis by up-regulating the expression of different cytokines, which act as autocrine growth factors or regulate the anti-tumoral immune response.<sup>3,36,37</sup> Because IL-27 had been shown to stimulate the proliferation of CD4-positive T lymphocytes and had been suggested to suppress T-cell activation, we initially speculated that IL-27 may be expressed by tumoral cells and play a role in tumor progression, either as an autocrine growth factor as has been demonstrated for IL-2 and IL-15 in ATL, or as a suppressor of T-cell activation to dampen anti-viral or anti-tumoral responses. Our data do not support this hypothesis, because in most cases, EBI3 expression by tumoral cells was not associated with that of p28, suggesting that no or very little IL-27 is produced by tumoral cells. Also, although HL-derived cell lines, LCLs, and HTLV-1-infected cell lines expressed IL-27R, we could not observe a role for IL-27 on their growth either by using anti-IL-27 neutralizing antibodies or by adding recombinant IL-27 (F.L., E.B., O.D., unpublished data). Very recently, IL-27 was shown to display potent *in vivo* anti-tumoral activity in a murine tumor model and to function as an adjuvant on the induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes.<sup>38,39</sup> In view of these novel roles for IL-27, our failure to detect significant production of IL-27 by tumoral cells may not be surprising.

An initial study of EBI3 and p28 expression profile in various *in vitro* cultured cells and in tissues demonstrated that the expression of both subunits of IL-27 overlaps only partially, and that EBI3 displays a broader expression profile than that of p28. Also, the kinetics of expression of both subunits within a given cell type was not coordinated.<sup>5</sup> These observations lead to the hypothesis that EBI3 may play a role independently from its association to p28. The dissociated expression pattern of EBI3 and p28 we observed in this study further supports this hypothesis. At present no function has been reported for EBI3 alone, although a role as an IL-27 antagonist has been suggested.<sup>5</sup> If so, EBI3 overexpression by tumoral cells may be part of a strategy to antagonize IL-27 anti-tumoral activity. EBI3 associates not only with p28, but also with the p35 subunit of IL-12,<sup>40</sup> but a biological function for EBI3/p35 heterodimer remains to be established. The existence of another partner for EBI3 has also been suggested by studies of EBI3 knockout mice.<sup>41</sup> Elucidation of the respective roles of the different forms of EBI3 (EBI3, EBI3/p28, EBI3/p35) will allow a better comprehension of the role played by this molecule in the regulation of immune responses and in anti-tumoral immunity.

## References

1. Rickinson A, Kieff E: Epstein-Barr virus. *Fields Virology*, 4th ed. Edited by Knipe DM, Howley PM. Philadelphia, Lippincott/Williams & Wilkins Co., 2001, pp 2575–2628
2. Küppers R: B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:801–812
3. Yoshida M: Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* 2001, 19:475–496
4. Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, Birkenbach M: A novel interleukin-12 p40-related protein

- induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* 1996, 70:1143–1153
5. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA: IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 2002, 16:779–790
6. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA: WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 2004, 172:2225–2231
7. Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H: Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 2003, 170:4886–4890
8. Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA: IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 2003, 23:513–522
9. Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ: IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:15047–15052
10. Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A, Grewal IS, de Sauvage FJ: Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 2000, 407:916–920
11. Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, Xia M, Wakeham AC, Nishina H, Potter J, Saris CJ, Mak TW: WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. *Immunity* 2001, 15:569–578
12. Larousserie F, Pflanz S, Coulomb-L'Herminé A, Brousse N, Kastelein R, Devergne O: Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. *J Pathol* 2004, 202:164–171
13. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA: The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003, 19:641–644
14. Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H: WSX-1 is required for resistance to Trypanosoma cruzi infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 2003, 19:657–667
15. Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein RA, Saris C, Hunter CA: The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 2003, 19:645–655
16. Devergne O, Cahir McFarland ED, Mosialos G, Izumi KM, Ware CF, Kieff E: Role of the TRAF binding site and NF-κB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* 1998, 72:7900–7908
17. Cahir McFarland ED, Izumi KM, Mosialos G: Epstein-Barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-κB. *Oncogene* 1999, 18:6959–6964
18. Niedobitek G, Pazolt D, Teichmann M, Devergne O: Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EBI3, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 2002, 198:310–316
19. Hiscott J, Kwon H, Genin P: Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-κB pathway. *J Clin Invest* 2001, 107:143–151
20. Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, Yamamoto N: Constitutive activation of NF-κB in primary adult-T-cell leukemia cells. *Blood* 1999, 93:2360–2368
21. Arima N, Matsushita K, Obata H, Ohtsubo H, Fujiwara H, Arimura K, Kukita T, Suruga Y, Wakamatsu S, Wakamatsu S, Hidaka S, Tei C: NF-κB involvement in the activation of primary adult-T-cell leukemia cells and its clinical implications. *Exp Hematol* 1999, 27:1168–1175
22. Shimoyama M: Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. *Br J Haematol* 1991, 79:428–437
23. Devergne O, Coulomb-L'Herminé A, Capel F, Moussa M, Capron F: Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pathol* 2001, 159:1763–1776
24. Cahir-McFarland ED, Carter K, Rosenwald A, Giltman JM, Henrickson SE, Staudt LM, Kieff E: Role of NF-κB in cell survival and tran-

- scription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J Virol* 2004, 78:4108–4119
25. Li J, Peet GW, Balzarano D, Li X, Massa P, Barton RW, Marcu KB: Novel NEMO/I $\kappa$ B kinase and NK- $\kappa$ B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J Biol Chem* 2001, 276:18579–18590
  26. Dadgostar H, Zarnegar B, Hoffmann A, Qin XF, Truong U, Rao G, Baltimore D, Cheng G: Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:1497–1502
  27. Smith MR, Greene WC: Identification of HTLV-1 tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev* 1990, 4:1875–1885
  28. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, Fujii M: Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF- $\kappa$ B and induces apoptosis of HTLV-1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 2002, 100:1828–1834
  29. Nagai T, Devergne O, Mueller TF, Perkins DL, van Seventer JM, van Seventer GA: Timing of IFN- $\beta$  exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN- $\beta$ -mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation. *J Immunol* 2003, 171:5233–5243
  30. Staudt LM: The molecular and cellular origins of Hodgkin's disease. *J Exp Med* 2000, 191:207–212
  31. Skinnider BF, Mak TW: The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002, 99:4283–4297
  32. Setoyama M, Fujiyoshi T, Mizoguchi S, Katahira Y, Yashiki S, Tara M, Kanzaki T, Sonoda S: HTLV-1 messenger RNA is expressed in vivo in adult-T-cell leukemia/lymphoma patients: an in situ hybridization study. *Int J Cancer* 1994, 57:760–764
  33. Ohshima K, Suzumiya J, Izumo S, Mukai Y, Tashiro K, Kikuchi M: Detection of human T-lymphotropic virus type-I DNA and mRNA in the lymph nodes using polymerase chain reaction in situ hybridization (PCR/ISH) and reverse transcription (RT-PCR/ISH). *Int J Cancer* 1996, 66:18–23
  34. Horie R, Watanabe M, Ishida T, Koiwa T, Aizawa S, Itoh K, Higashihara M, Kadin ME, Watanabe T: The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF- $\kappa$ B activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell* 2004, 5:353–364
  35. Izban KF, Ergin M, Qin JZ, Martinez RL, Pooley Jr RJ, Saeed S, Alkan S: Constitutive expression of NF- $\kappa$ B is a characteristic feature of mycosis fungoides: implications for apoptosis resistance and pathogenesis. *Hum Pathol* 2000, 12:1482–1490
  36. Mosialos G: Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001, 12:259–270
  37. Matsuoka M: Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene* 2003, 22:5131–5140
  38. Hisada M, Kamiya S, Fujita K, Belladonna ML, Aoki T, Koyanagi Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T: Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res* 2004, 64:1152–1156
  39. Devergne O, Birkenbach M, Kieff E: Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:12041–12046
  40. Nieuwenhuis EE, Neurath MF, Corazza N, Iijima H, Trgovcich J, Wirtz S, Glickman J, Bailey D, Yoshida M, Galle PR, Kronenberg M, Birkenbach M, Blumberg RS: Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:16951–16956
  41. Matsui M, Moriya O, Belladonna ML, Kamiya S, Lemonnier FA, Yoshimoto T, Akatsuka T: Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice. *J Virol* 2004, 78:9093–9104



# **PARTIE III**

## **IL-27 et lymphocyte B humain:**

### **Etude de l'expression et du rôle de l'IL-27 au cours de la différenciation lymphocytaire B normale et analyse de son expression dans les lymphomes B**

#### **Manuscrits soumis :**

. Differential effects of IL-27 on human B cell subsets.

Frédérique Larousserie, Pascaline Charlot, Emilie Bardel, Josy Froger, Rob Kastelein,  
Odile Devergne

The Journal of Immunology, en révision

. Variable expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 during normal B-cell  
differentiation and among B-cell lymphomas.

Frédérique Larousserie, Emilie Bardel, Aurore Coulomb L'Herminé, Danielle Canioni,  
Nicole Brousse, Rob Kastelein, Odile Devergne

The Journal of Pathology, en révision

Dans l'étude initiale décrivant l'identification de l'IL-27, Pflanz et coll. avaient montré que cette nouvelle cytokine augmente la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Pflanz, Immunity 2002), ce qui nous avait conduit à émettre l'hypothèse que l'IL-27 puisse constituer un facteur de croissance pour les cellules T tumorales. Au cours de nos premières études de l'expression de l'IL-27 *in situ* par immunohistochimie, nous avons observé que des cellules lymphoïdes situées dans les CG des ganglions hyperplasiques, et des cellules tumorales de certains lymphomes B contrôles, exprimaient EB13. Sur ces bases, nous avons cherché à déterminer si dans ces cellules l'expression de p28 était associée à celle d'EB13, et si l'IL-27 pouvait exercer des effets sur les cellules B, notamment sur leur prolifération, et constituer ainsi un facteur de croissance autocrine pour les cellules B tumorales. Jusqu'alors, aucun rôle de l'IL-27 n'avait été mis en évidence dans les cellules B, chez l'Homme ou la Souris.

Afin de mettre en évidence un éventuel effet de l'IL-27 sur les lymphocytes B, nous avons d'abord analysé l'expression du récepteur de haute affinité de l'IL-27 à la surface de cellules B normales purifiées à partir d'amygdales humaines. Par immunomarquage et analyse en cytométrie de flux, nous avons montré que les deux chaînes du récepteur sont exprimées à la surface de ces cellules, et que leur expression est régulée au cours de l'activation et de la différenciation B.

Le récepteur de l'IL-27 exprimé par les lymphocytes B est fonctionnel. En effet, sa stimulation entraîne une forte phosphorylation de STAT1 et STAT3. Comme dans les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves, l'IL-27 induit dans les cellules B normales activées l'expression de T-bet. Par contre l'induction de l'expression de la chaîne  $\beta 2$  du récepteur de l'IL-12 par l'IL-27 n'est observée que dans certaines conditions. L'IL-27 module également l'expression de plusieurs molécules, CD54 (ICAM-1), CD95 (Fas) et CD86 (B7.2), à la surface des lymphocytes B activés par anticorps anti- $\mu$ . De plus, nous montrons que l'IL-27 a un effet sur la prolifération des cellules B : elle augmente la prolifération des cellules B activées, cet effet étant maximal sur les cellules B naïves stimulées par anticorps anti- $\mu$ .

Dans le même temps, nous avons analysé le profil d'expression de l'IL-27 dans les lymphocytes B normaux et tumoraux. Ainsi, nous avons analysé l'expression de l'IL-27 *in*

*in vitro* dans des cellules B d'amygdales. Un faible niveau d'expression d'EBI3 est observé par western blot dans les lysats cellulaires de cellules B fraîchement isolées. Il est augmenté lorsque les cellules B sont activées par anticorps anti-CD40 ou anti- $\mu$ . Cette induction de l'expression d'EBI3 dépend de l'activation de NF- $\kappa$ B, l'addition de l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B BAY11-7082 pendant la culture diminuant cette induction de façon dose dépendante. Nous n'avons pas détecté le transcrite de p28 dans ces cellules et ni la sécrétion d'IL-27 dans les surnageants de culture.

Nous avons analysé en parallèle l'expression d'EBI3 et de p28 *in situ* dans des organes lymphoïdes secondaires, amygdales (n=11), ganglions (n=7) et rates (n=8), et dans des lymphomes B (n=64). Nous avons observé qu'EBI3 est exprimée à des stades précis de la différenciation lymphocytaire B normale. Dans les tissus lymphoïdes non tumoraux, les cellules EBI3<sup>+</sup> sont principalement situées dans la zone claire des CG. Elles ont une morphologie particulière, le plus souvent de type blastique avec un noyau ovale volumineux, vésiculeux et nucléolé. Quelques-unes ont une morphologie de centrocyte. Des double marquages en immunohistochimie ont montré que ces cellules sont bien de phénotype B (CD20<sup>+</sup>), que plus de la moitié sont en cycle (Ki-67<sup>+</sup>) et qu'une fraction exprime le marqueur de différenciation plasmocytaire MUM1 (10 à 30%). Fait intéressant, certaines de ces cellules sont en étroit contact avec un petit lymphocyte T CD3<sup>+</sup>. Ces cellules EBI3<sup>+</sup> pourraient correspondre à des cellules B stimulées par l'interaction T/B, engagées dans la prolifération, et/ou dans la voie de différenciation plasmocytaire (plasmablastes). Nous avons également observé quelques cellules EBI3<sup>+</sup> dans les territoires extrafolliculaires. Celles-ci présentent des caractéristiques morphologiques et phénotypiques similaires aux cellules B EBI3<sup>+</sup> du CG. Elles pourraient correspondre à des plasmablastes issus de la voie de différenciation B extrafolliculaire. En accord avec nos résultats *in vitro*, nous n'avons pas détecté d'expression de p28 *in situ* dans les cellules B EBI3<sup>+</sup>.

Dans les lymphomes B, nous avons observé une expression hétérogène d'EBI3 par les cellules tumorales. Dans les lymphomes du manteau (n=6), les LLC/lymphomes lymphocytiques (n=7), les lymphomes de la zone marginale (n=7), les lymphomes lymphoplasmocytaires (n=5) et les myélomes (n=5), l'expression d'EBI3 par les cellules

tumorales était nulle ou concernait moins de 10% d'entre-elles. En revanche, nous avons observé une expression plus fréquente d'EBI3 dans les lymphomes folliculaires (n=11), avec 10 à 30% de cellules tumorales marquées dans la moitié des cas, et surtout dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (n=22), avec plus de 30% des cellules tumorales marquées dans 80% des cas, sans différence entre les sous-types « germinal center B-cell like » (n=7) et non « germinal center B-cell like » (n=15). Comme dans les lymphocytes B normaux, l'expression d'EBI3 par les lymphocytes B tumoraux ne s'accompagnait pas d'expression détectable de p28.

Ces travaux montraient pour la première fois un effet de l'IL-27 sur les B chez l'Homme, en particulier un effet sur la croissance des cellules B normales. Cependant, l'hypothèse d'un éventuel rôle de facteur de croissance autocrine de l'IL-27 pour les lymphomes B n'est pas confirmée. En effet, si nous avons mis en évidence une forte expression d'EBI3 par les cellules tumorales dans certaines formes de lymphomes, nous n'avons pas pu mettre en évidence de production de p28, et donc d'IL-27, par ces cellules. Toutefois, un rôle paracrine de l'IL-27 sur la croissance des cellules B tumorales reste possible.

## **Differential effects of IL-27 on human B cell subsets <sup>1</sup>**

Running title: IL-27 effects on human B cells

Frédérique Larousserie <sup>2\*</sup>, Pascaline Charlot <sup>2\*</sup>, Emilie Bardel <sup>\*</sup>,  
Josy Froger <sup>†</sup>, Robert A. Kastelein <sup>§</sup>, Odile Devergne <sup>3\*</sup>

<sup>\*</sup> CNRS UMR 8147, Université Paris V, Institut Fédératif de Recherche Necker, Paris, France

<sup>†</sup> INSERM U564, Angers, France

<sup>§</sup> Schering-Plough Biopharma (formerly DNAX), Palo Alto, CA, USA

Keywords : Human, B cells, cytokines, cell activation, cell proliferation

## **ABSTRACT**

IL-27 is a novel heterodimeric cytokine of the IL-12 family that plays an important role in the regulation of T cell responses. Its role on human B cells has not been previously studied.

Here, we show that both chains of IL-27 receptor complex, IL-27R and gp130, are constitutively expressed at the surface of naive and memory human tonsillar B cells, and are induced on germinal center (GC) B cells following CD40 stimulation. In naive B cells, IL-27 induced strong STAT1 and STAT3 phosphorylation, while it induced moderate STAT1 and low STAT3 activation in memory B cells. IL-27 induced T-bet expression in naive and memory B cells stimulated by CD40 or surface Ig engagement, but induced significant IL-12R $\beta$ 2 surface expression in anti-Ig-stimulated naive B cells only. In anti-Ig-stimulated naive or memory B cells, IL-27 also induced CD54, CD86, and CD95 surface expression. In addition, IL-27 increased proliferation of anti-Ig-activated naive B cells and of anti-CD40-activated naive and GC B cells, but not of CD40-activated memory B cells. These data indicate that the B cell response to IL-27 is modulated during B cell differentiation and varies depending on the mode of B cell activation.

## INTRODUCTION

IL-27 is a new heterodimeric cytokine of the IL-12 family that is composed of two chains, EBV-induced gene 3 (EBI3), a 33 kDa glycosylated protein homologous to the p40 subunit of IL-12 (1), and p28, a 28 kDa peptide analogous to the p35 subunit of IL-12 (2). In mouse or human primary cultures *in vitro*, IL-27 was found to be primarily expressed by activated monocytes and monocyte-derived dendritic cells, while in human tissues EBI3 and p28 co-expression was predominantly observed in macrophages or macrophage-derived cells and in endothelial cells (2-4). IL-27 receptor complex comprises two  $\beta$  chains, IL-27R (also called WSX-1 or TCCR) and gp130 (2, 5). IL-27 is the only known ligand for IL-27R, whereas gp130 is a receptor component of several cytokines of the IL-6 family. By quantitative RT-PCR, IL-27R and gp130 were found to be co-expressed by a large variety of cells including monocytes, dendritic cells, T and B lymphocytes, NK cells, mast cells, and endothelial cells (5), indicating that IL-27 may display pleiotropic functions.

So far, most studies on the role of IL-27 in immunity have focused on its role in the regulation of T cell and inflammatory responses (reviewed in ref. 6, 7). Initial studies showed that IL-27 plays an important role in the early development of Th1 responses. Specifically, IL-27 was shown to act on naive CD4<sup>+</sup> T cells through activation of the Jak/STAT pathway (8-11). In these cells, IL-27 induces expression of the Th1-specific transcription factor, T-bet, and of the  $\beta$ 2 chain of IL-12 receptor, thereby conferring responsiveness to IL-12. IL-27 also synergizes with IL-12 for IFN- $\gamma$  production by naive CD4<sup>+</sup> T cells, and induces proliferation of naive but not memory CD4<sup>+</sup> T cells (2). Consistent with these *in vitro* data, mice deficient for IL-27R showed impaired Th1 responses to intracellular pathogens, *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* (12, 13). Subsequent studies using mouse models showed that IL-27 roles were broader and more complex, and a role for IL-27 both as positive and negative regulator of T cell responses has emerged (14-23). Studies with IL-27R<sup>-/-</sup> mice also indicated a role for IL-27R as a negative regulator of innate immunity and of inflammatory responses (15, 19, 22, 24). In addition, IL-27 was recently shown to act directly on naive CD8<sup>+</sup> T cells of mouse spleen by increasing granzyme B expression and subsequent

CTL activity (25), consistent with the anti-tumoral role of IL-27 and its adjuvant activity on the CTL response observed in various mouse models *in vivo* (26-29). In addition to its direct role on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, IL-27 also acts directly on monocytes and mast cells, in which it induces gene expression of inflammatory cytokines (5).

Little is known on the role of IL-27 in the B cell response. In germinal centers (GC) of B cell follicles of secondary lymphoid organs, the naive B cell that has encountered a specific Ag undergoes a succession of events, including proliferation, somatic hypermutation, Ig class switching, apoptosis or positive selection, leading to terminal differentiation into a plasma cell or a memory B cell with high specificity for the Ag (reviewed in ref 30-32). This set of events is regulated by cytokines at different steps. A recent study showed that IL-27 induced IgG2a class switching in mouse spleen cells (33). No data have been reported on its role on human B cells. In the present study, we analyzed the expression profile of both chains of IL-27 receptor, IL-27R and gp130, on the surface on human tonsillar B cells, and investigated IL-27 effects on total tonsillar B cells and on the three main B cell subsets present in tonsils, ie naive, GC, and memory B cells. Our results indicate that IL-27 receptor expression is highly regulated during B cell differentiation and activation, and that IL-27 effects vary depending on the stage of B cell differentiation and on the co-stimulus delivered to the B cell.



## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of human B cells and B cell subsets

B cells were isolated from human tonsils obtained with informed consent from patients undergoing tonsillectomy at Necker Hospital. Tonsils were grinded and the cell suspension was filtered through gauze. Tonsillar mononuclear cells were then isolated by Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) density centrifugation and subjected to CD2 microbead depletion and magnetic separation by using LS column (Miltenyi Biotec). The resulting B cell preparations were consistently from >98% to 99.5% CD19<sup>+</sup> as assessed by FACS analysis. Naive, GC and memory B cells, were isolated by magnetic separation based on their differential expression levels of two cell surface markers, IgD and CD38 (Figure 1). Total B cells were separated into IgD<sup>+</sup> (naive B cells) and IgD<sup>-</sup> populations using anti-IgD mAb (mouse IgG2a, BD Biosciences) followed by goat anti-mouse IgG microbeads (Miltenyi Biotec), and magnetic separation by using LS column (Miltenyi Biotec). IgD<sup>-</sup> cells were further separated into IgD<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> (memory B cells) and IgD<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> (GC B cells) by incubation with anti-CD38-FITC mAb (BD Biosciences) followed by anti-FITC microbeads (Miltenyi Biotec) and separation by using LS column. The negative fraction (memory B cells) was collected and the positive fraction was passed again over a MS column to remove CD38<sup>low</sup> cells from the GC B cell fraction. As assessed by FACS analysis, the purity of each isolated B cell subset was  $\geq 95\%$ .

Purified B cells or B cell subsets ( $2.10^6$ /ml) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics, in the presence of goat polyclonal anti- $\mu$  or anti- $\gamma$  F(ab')<sub>2</sub> fragment (Jackson ImmunoResearch Laboratories), goat polyclonal CD40 Ab (R&D Systems), *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC) (Pansorbin, Calbiochem), and IL-27 (DNAX Research Institute), alone or in combination. IL-27 was used at 50 ng/ml, unless otherwise indicated. For STAT activation assay, B cells ( $5.10^6$ /ml) were incubated in RPMI 1640 medium containing 2% FBS, with or without IL-27 for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by diluting cells in cold PBS containing 2% FBS and 0.01% sodium azide.

### **Cell surface immunofluorescent staining and FACS analysis**

Purified total B cells ( $5 \cdot 10^5$  to  $1.5 \cdot 10^6$  per staining) were saturated in PBS containing 20% normal human serum for 20 min prior to incubation with specific Abs. All stainings and washes were performed in FACS buffer (PBS containing 2% FBS and 0.01% sodium azide). IL-27R, gp130, and IL-12R $\beta$ 1 were detected respectively with mouse anti-TCCR mAb (IgG2b, R&D Systems), mouse anti-gp130 mAb (IgG1, developed in Hugues Gascan's laboratory, INSERM U564, Angers, France), and mouse anti-IL-12R $\beta$ 1 mAb (IgG1, BD Biosciences) at 10  $\mu$ g/ml, in parallel with the isotype control mAbs, MOPC141 (mouse IgG2b, Sigma) and MOPC21 (mouse IgG1, Sigma), followed by PE-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (Beckman Coulter). IL-12R $\beta$ 2 was detected with rat anti-IL-12R $\beta$ 2 mAb (IgG2a, BD Biosciences) at 10  $\mu$ g/ml in parallel with a rat IgG2a isotype control (R&D Systems), followed by PE-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rat IgG (Beckman Coulter). PE-labeled cells were then stained simultaneously with anti-CD38-phycoerythrin-cyanine 5 (PC5) and anti-IgD-FITC mAbs (BD Biosciences) to identify the different B cell subsets. For the detection of cell surface expression of CD10, CD11a, CD23, CD25, CD39, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86, CD95, HLA DR, and HLA class I, total B cells were stained simultaneously with PE-conjugated specific Abs (all from BD Biosciences), together with anti-CD38-PC5 and anti-IgD-FITC Abs. CD19-FITC (Beckman Coulter), CD38-FITC (BD Biosciences), and IgD-FITC (DakoCytomation) Abs were used to verify the purity of total B cell or B cell subset purification. Cells were analyzed on FACSCAN using Cellquest software.

### **Proliferation assay**

For proliferation assays, B cells ( $2 \cdot 10^5$  per well) were cultured in 96-well plates for 3 days. Proliferation was measured by adding 0.5  $\mu$ Ci per well of [<sup>3</sup>H]-thymidine (Amersham Biosciences) for the last 10 to 15 hours of the third day of incubation. Cells were then collected and [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was measured in a  $\beta$ -scintillation counter. Results

are expressed in cpm (mean of triplicates +/- SD). A Wilcoxon test was used for statistical analysis. A p value <0.01 was considered as significant.

### **Western blot analysis**

Before lysis, cells were washed in ice-cold PBS. For STATs analysis, cells were lysed for 1 hr on ice in lysis buffer (1% Nonidet P-40, 50 mM Tris, pH7.4, 150 mM NaCl, 3% glycerol, 1.5 mM EDTA) containing protease inhibitors (1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml leupeptin) and phosphatase inhibitors (1 mM Na<sub>3</sub>V0<sub>4</sub>, 10 mM NaF). Cell lysate was centrifuged for 15 min at 13 000 X g and the supernatant was assayed for protein concentration using the microBCA protein assay (Pierce).

T-bet expression was analyzed from nuclear extracts. To this end, cells were lysed for 30 min on ice in lysis buffer A (0.1% Nonidet P-40, 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA) containing protease inhibitors as indicated above. Cell lysate was centrifuged for 15 min at 13 000 X g, and the cell pellet was subjected to a second extraction in lysis buffer B (20 mM Hepes pH 7.9, 1 mM EDTA, 420 mM NaCl, 10% glycerol) supplemented with protease inhibitors, for 1 hr on ice. Cell lysate was centrifuged for 15 min at 13 000 X g, and protein concentration of the nuclear extract was determined as indicated above. Lysates were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for immunoblotting. Tyrosine phosphorylated STATs proteins were detected using polyclonal rabbit anti-phospho STAT1, 2, 3, 5, 6 Abs (Cell Signaling Technology, 1:1000 dilution). STAT1 was detected with rabbit polyclonal Ab (Cell Signaling Technology, 1:1000 dilution) and STAT3 was detected with mouse F-2 mAb (Santa Cruz, 2 µg/ml). T-bet was detected with mouse 4B10 mAb (Santa Cruz, 2 µg/ml). Binding of mouse or rabbit Abs was detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or horseradish peroxidase-conjugated protein A, respectively (Amersham Biosciences). Peroxidase reaction was developed with chemiluminescence reagents (Pierce).

## RESULTS

### Surface expression of IL-27R and gp130 on human tonsillar B cells

Previous studies of IL-27 receptor expression in B cells analyzed the expression of IL-27R subunits at the mRNA level by RT-PCR analysis of total B cells (5, 33). In this study, we investigated by FACS analysis the cell surface expression of both chains of the IL-27 receptor complex, IL-27R and gp130, on total human tonsillar B cells and on the different B cell subsets. As shown on Figure 2, both chains were detected on unstimulated total tonsillar B cells. Interestingly, levels of IL-27R expression were very variable depending on the stage of B cell differentiation. Thus, IL-27R was readily detected on both IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> naive B cells and IgD<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> memory B cells, but was barely detectable on IgD<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> GC B cells. In contrast, gp130 was expressed at similar low levels in all 3 B cell subsets. This expression profile was independent of the donor, since similar data were observed using B cells from 5 different donors.

To investigate the effect of CD40 and surface Ig ligation on IL-27R and gp130 expression levels, B cells were stimulated for one or two days with anti-CD40 or anti- $\mu$  Abs (Figure 2). Following CD40 activation, IL-27R and gp130 surface expression was increased on each B cell subset, notably on IgD<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> GC B cells that, once activated, displayed significant levels of both chains of the IL-27 receptor. This increased expression was already observed after one day stimulation, and was more pronounced after two days of stimulation (Figure 2 and data not shown). Anti- $\mu$  stimulation resulted in a similar increase of IL-27R and gp130 surface expression on IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> naive and IgD<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> memory B cells. Regarding IgD<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> GC B cells, no or very low increase of both chains was observed following one day of anti- $\mu$  Ab stimulation. After two days of anti- $\mu$  stimulation, their number was in most experiments too low to allow their analysis (data not shown). Combination of anti-CD40 and anti- $\mu$  stimulation resulted in expression levels similar to those observed with anti-CD40 Ab alone (data not shown).

Taken together, these data indicate that the expression of IL-27 receptor is highly regulated during B cell differentiation and following B cell activation.

### **IL-27 activates STAT1 and STAT3 in human tonsillar B cells**

To verify that the IL-27 receptor expressed on human tonsillar B cells is functional, we analyzed by western blot the activation of STAT proteins in response to IL-27 stimulation. As shown on Figure 3A, incubation of freshly purified total B cells with IL-27 resulted in strong STAT1 and STAT3 tyrosine phosphorylation. No STAT2, STAT5, or STAT6 activation was observed (data not shown).

To determine in which B cell subsets STAT1 and STAT3 are activated, we performed similar experiments using magnetically purified B cell subpopulations (Figure 3B). A strong STAT1 and STAT3 phosphorylation was consistently observed in naive B cells. In memory B cells, a strong STAT1 phosphorylation and a weak STAT3 phosphorylation were observed. Despite of a lower total STAT1 protein level and of very low levels of IL-27R and gp130 at the cell surface, a weak phosphorylation of STAT1 and STAT3 was detected in GC B cells. Although we cannot exclude that this weak signal may be in part due to the presence of <5% contaminating naive B cells, this suggests that the low level of IL-27 receptor expression detected on GC B cells may be sufficient to induce a weak STAT activation. Thus, while STAT1 and STAT3 activation was observed in each B cell subset in response to IL-27, the extent of STAT1 and STAT3 phosphorylation was very variable depending on the B cell subset.

### **IL-27 induces T-bet expression in anti-CD40 or anti-Ig activated naive and memory B cells**

In mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> naive T cells, IL-27 induces T-bet expression in a STAT1-dependent manner (11, 25). To investigate whether IL-27 induces T-bet expression in human tonsillar B cells, total B cells were stimulated for one or two days with anti-CD40 Ab, alone or in the presence of IL-27, and nuclear extracts were analyzed by immunoblotting for T-bet expression. As shown on Figure 4A (left panel), IL-27 increased T-bet expression in CD40-stimulated total B cells. This induction was already maximal after one day of stimulation.

Similarly, IL-27 induced T-bet expression in total B cells stimulated for one day with anti- $\mu$  Ab (Figure 4A, right panel).

Since we previously observed a strong STAT1 phosphorylation in naive and memory B cells, we analyzed T-bet induction in these two B cell subsets activated via CD40 or via their surface Ig (anti- $\mu$  Ab for naive B cells, and a combination of anti- $\mu$  and anti- $\gamma$  Abs for optimal stimulation of memory B cells) (Figure 4B). Our results indicated that IL-27 induced significant T-bet expression in anti-CD40- or anti- $\mu$ -stimulated naive B cells. Induction of T-bet by IL-27 was also observed in anti-CD40- or anti-Ig-stimulated memory B cells. However, T-bet induction in these latter was weaker than the one observed in naive B cells (Figure 4B).

### **Variable induction of IL-12R $\beta$ 2 expression by IL-27 in stimulated total B cells and B cell subsets**

Next, we examined whether IL-27-mediated T-bet induction observed in B cells is followed by induction of IL-12R $\beta$ 2 expression, as it has been demonstrated in mouse and human CD4<sup>+</sup> T cells and in mouse CD8<sup>+</sup> T cells (8-10, 25). In parallel, we analyzed IL-27 effect on the expression of the  $\beta$ 1 chain of the IL-12 receptor.

By cell surface staining and FACS analysis, IL-12R $\beta$ 2 chain was undetectable in freshly isolated tonsillar B cells (Figure 5A). Stimulation with either anti-CD40 Ab or anti-Ig Ab (anti- $\mu$  Ab alone or in combination with anti- $\gamma$  Ab) failed to induce detectable expression of this chain (Figure 5A). In contrast, IL-12R $\beta$ 1 chain was detected in unstimulated naive, GC and memory B cells, and its expression increased on each B cell subset following anti-CD40 or anti-Ig stimulation (Figure 5A).

When B cells were stimulated for 2 days with anti-CD40 Ab in the presence of IL-27, a weak increase of IL-12R $\beta$ 1 surface expression was consistently observed on total B cells, compared to B cells stimulated with anti-CD40 Ab alone (Figure 5B). This induction was observed on naive B cells and occasionally on memory B cells, but not on GC B cells (data not shown). Similarly, a weak induction of IL-12R $\beta$ 1 was consistently observed on total and naive B cells stimulated with anti-Ig Abs (anti- $\mu$  Ab or a combination of anti- $\mu$  and anti- $\gamma$

Abs). Under these conditions, no or a very weak induction was observed on memory B cells. These data were consistent among the different donors tested (5 and 6 different donors tested for anti-CD40 or anti-Ig stimulation, respectively).

When B cells were stimulated via CD40, no induction of IL-12R $\beta$ 2 expression by IL-27 was observed on total B cells or on B cell subsets (6 different donors tested, Figure 5B and data not shown). In contrast, when IL-12R $\beta$ 2 induction was analyzed on B cells stimulated with anti-Ig Abs, variable results were observed depending on the donor. In 4 out of 6 donors, a significant induction of IL-12R $\beta$ 2 expression by IL-27 was observed, while no induction was detected in the two remaining donors. In all 4 responding donors, IL-12R $\beta$ 2 induction was observed in naive B cells, but generally not on memory B cells (Figure 5B). On both total and naive B cells, induction of IL-12R $\beta$ 2 expression by IL-27 was heterogeneous, in that only a fraction of cells showed IL-12R $\beta$ 2 positivity (Figure 5B).

Altogether, these data indicated that the pattern of IL-12R $\beta$ 2 induction by IL-27 did not overlay with that of T-bet induction. Indeed, although induction of T-bet expression by IL-27 was observed in CD40-stimulated B cells, no induction of IL-12R $\beta$ 2 expression by IL-27 was detected in these cells. In particular, lack of induction of IL-12R $\beta$ 2 expression was observed using B cells from donors that were tested for T-bet induction and showed significant induction of T-bet expression by IL-27 (B cells from the same donor were used for the experiments shown in Figure 4A, left and Figure 5B). Also, the low level of T-bet induction by IL-27 observed in anti-Ig-stimulated memory B cells was not sufficient to induce detectable induction of IL-12R $\beta$ 2 expression in this specific B cell subset.

### **IL-27 induces surface expression of CD54 (ICAM-1), CD95 (Fas) and CD86 (B7.2) on anti-Ig-stimulated naive and memory B cells**

In addition to IL-12R $\beta$ 1 and  $\beta$ 2, we investigated whether IL-27 could modulate the expression level of various cell surface molecules known to be regulated following B cell activation. Of the various B cell surface molecules analyzed (CD10, CD11a, CD23, CD25, CD39, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86, CD95, HLA-DR, and HLA class I) only 3 of them, CD54, CD86, and CD95, showed consistent variation in their surface expression in the presence of IL-27.

Thus, as shown in Figure 6, IL-27 increased expression of CD54, CD86, and CD95 on anti- $\mu$ -stimulated total B cells. This induction was observed on both naive and memory B cells, although it was weaker on these latter. Induction of CD54 and CD95 expression was already detectable after one day of stimulation, while induction of CD86 expression was generally detectable only after two days of stimulation. Similar induction data were observed when B cells were stimulated with a combination of anti- $\mu$  and anti- $\gamma$  Abs (data not shown). However, no or very weak induction of these 3 molecules by IL-27 was observed in anti-CD40-stimulated B cells (data not shown). In contrast to the variable data obtained for IL-12R $\beta$ 2, similar data were observed using tonsillar B cells from different donors (6 different donors tested).

### **IL-27 enhances proliferation of activated naive and GC B cells**

The effect of IL-27 on B cell proliferation has not been previously investigated. To investigate a possible effect of IL-27 on B cell proliferation, total B cells were incubated for 3 days with suboptimal doses of either anti-CD40 Ab (0.1, 0.25, or 0.5  $\mu$ g/ml) or anti- $\mu$  Ab (2, 5, or 10  $\mu$ g/ml) in the absence or presence of IL-27, and DNA synthesis was assessed by thymidine incorporation. In each condition, addition of IL-27 resulted in increased B cell proliferation (Figure 7A). The proliferative effect of IL-27 was modest on CD40-stimulated B cells, and more pronounced on anti- $\mu$ -stimulated B cells. On average, proliferation of anti-CD40-stimulated B cells increased by >70% in the presence of IL-27, while that of anti- $\mu$ -stimulated B cells increased by 400% ( $p < 0.01$ ). No consistent increase was observed in anti- $\gamma$ -stimulated B cells (data not shown). This proliferative effect of IL-27 was dose-dependent. On anti- $\mu$ -stimulated B cells, a positive effect of IL-27 was already detectable with 1 ng/ml of IL-27, and maximal effects were observed at concentrations ranging from 50 to 100 ng/ml of IL-27 (Figure 7B and data not shown).

Next, the proliferative response of the different B cell subsets to IL-27 was analyzed using purified B cell subsets. Because the different B cell subsets responded differently to each stimulus, different suboptimal concentrations of Abs were used to stimulate each B cell subset. We observed a positive effect of IL-27 on proliferation of anti- $\mu$ -stimulated naive B



cells, as their proliferation increased by >400% ( $p < 0.01$ ) (Figure 7C). In our experiments, no significant proliferative response to anti- $\mu$  stimulation alone was observed in GC and memory B cells, and addition of IL-27 had no significant effect (data not shown). When each B cell subset was stimulated with anti-CD40 Ab, proliferation of naive and GC B cells increased by 100% and 45%, respectively ( $p < 0.01$ ). In contrast, proliferation of CD40-stimulated memory B cells was not affected by IL-27 (Figure 7C). To determine whether the lack of response of memory B cells to IL-27 was specific to the stimulus (anti-CD40 Ab), other B cell stimuli were tested. When memory B cells were stimulated with SAC particles, results were similar to those obtained with anti-CD40 stimulation: addition of IL-27 did not increase memory B cell proliferation, while proliferation of SAC-stimulated naive B cells tested in parallel increased by 70% in the presence of IL-27 (Figure 7D). Only in anti- $\gamma$ -stimulated memory B cells was a small but not statistically significant proliferative effect of IL-27 observed (data not shown).

## DISCUSSION

This is the first report demonstrating a role of IL-27 on human B cells. With respect to B cells, only one recent study reported IL-27 effects on primary mouse spleen B cells (33). In that former study, the effects of IL-27 were studied on total B cells only. One subunit of IL-27 receptor complex, IL-27R, was detected at the mRNA level in total mouse spleen cells and was found to be expressed at similar levels in unstimulated or CD40-stimulated B cells. Stimulation of mouse spleen cells with IL-27 resulted in rapid STAT1 activation. In LPS-stimulated B cells, IL-27 was found to induce IgG2a class switching in a STAT1 and T-bet dependent manner. In contrast, in CD40-stimulated B cells, IL-27-induced IgG2a class switching was dependent on STAT1, but T-bet had no essential role (33). The effect of IL-27 on IL-12 receptor expression, cell proliferation, or expression of B cell activation markers, was not investigated.

Our results showed that IL-27 has direct effects on human tonsillar B cells and that the B cell response to IL-27 is regulated at multiple steps. First, surface expression of IL-27 receptor subunits is regulated during B cell differentiation and following B cell activation. Thus, while naive and memory B cells displayed constitutive expression of IL-27R and gp130, GC B cells exhibited barely detectable levels of IL-27R. The differential expression of IL-27R by the different B cell subsets is consistent with a previous study in which gene expression during GC reaction was tracked by gene profiling (34). In this study, IL-27R gene expression was found to be highly regulated during human B cell differentiation. Its expression was downregulated by 32-fold upon differentiation of naive B cells into GC B cells. During the GC to memory B cell transition, its expression was strongly upregulated (21.5 fold) to regain expression levels comparable to those observed in naive B cells. In addition, we found that expression of both chains of IL-27 receptor increased on each B cell subset upon *in vitro* B cell activation via CD40 or surface Ig. These results are in line with recent findings showing that mitogenic stimulation of mouse CD4<sup>+</sup> T cells through the TCR enhances IL-27R surface expression (35).

Second, independently from levels of IL-27 receptor surface expression, B cell subsets responded differently to IL-27. In most assays used in our study, naive B cells exhibited a stronger response than memory B cells to IL-27, although both subsets expressed comparable levels of IL-27 receptor surface expression. In naive B cells, a strong phosphorylation of both STAT1 and STAT3 was observed, while in memory B cells a moderate activation of STAT1 and a low activation of STAT3 were observed. Similar to STAT activation, a weaker induction of T-bet expression by IL-27 was observed in memory B cells than in naive B cells, regardless of the mode of B cell activation (CD40 or Ig stimulation). Also, IL-27-mediated induction of the expression of different surface molecules such as IL-12R $\beta$ 1 and  $\beta$ 2, CD54, CD86, and CD95, was generally more robust on naive B cells than on memory B cells. One striking difference between the two B cell subsets was their proliferative response to IL-27. Previous studies showed that IL-27 enhances proliferation of naive, but not memory, CD4<sup>+</sup> T cells stimulated by anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of anti-IL-2 Ab (2). In a similar manner, we found that, when stimulated with anti-CD40 Ab or SAC, IL-27 increased proliferation of naive B cells, but not that of memory B cells. This lack of effect on memory B cells was not due to the lack of a functional IL-27 receptor, since IL-27 induced expression of T-bet and others molecules in these cells. In mouse naive CD4<sup>+</sup> T cells, IL-27-induced proliferation has been shown to be STAT1-independent, whereas STAT3 was considered to be important for IL-27-induced proliferation (11). Taken together, this suggests that the lower level of STAT3 activation induced by IL-27 in memory B cells compared to naive B cells, may be involved in the lack of proliferative effect of IL-27 observed in memory B cells in these conditions.

This study also describes for the first time the expression of both chains of the IL-12 receptor, IL-12R $\beta$ 1 and IL-12R $\beta$ 2, at the surface of human tonsillar B cell subsets. In previous studies, expression of both chains was analyzed by RT-PCR analysis (36, 37). IL-12R $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 genes were found to be expressed at similar levels in each B cell subset. In our study, we detected constitutive surface expression of IL-12R $\beta$ 1 chain on each B cell subset. In contrast, IL-12R $\beta$ 2 chain was undetectable in unstimulated B cells, and was not induced following anti-CD40 or anti-Ig stimulation alone. Our failure to detect IL-12R $\beta$ 2 in these

conditions may be because of the lower sensitivity of the immunostaining technique compared to RT-PCR analysis. Regarding the induction of IL-12R $\beta$ 2 expression by IL-27, variable results were obtained depending on the donor and on the B cell stimulus. The fact that IL-12R $\beta$ 2 induction can be observed in anti- $\mu$ -stimulated B cells, but not anti-CD40-stimulated B cells, indicates that T-bet induction is not sufficient to induce detectable induction of IL-12R $\beta$ 2 expression, and that the B cell response to IL-27 depends on the mode of B cell activation. Further studies will be necessary to investigate the basis for the variable response observed among donors, while other parameters analyzed in this study showed little variability from donor to donor.

We observed an induction of CD54, CD86, and CD95 expression by IL-27 when B cells were stimulated via their surface Ig, but no or a very low induction when B cells were stimulated via CD40. This much lower IL-27 effect observed in this latter condition may be due to the already strong induction of these molecules by CD40 stimulation itself. Indeed, although both anti-Ig and anti-CD40 Abs induced expression of these molecules, the induction observed following anti-Ig stimulation was much weaker than the one observed following anti-CD40 stimulation (PC and OD, unpublished observations). Our finding that IL-27 induced ICAM-1 expression on human tonsillar B cells, is in line with a study published while this manuscript was in preparation, that showed induction of ICAM-1 expression by IL-27 in mouse CD4<sup>+</sup> T cells (38).

Altogether, these data indicate that IL-27 has multiple effects on B cells and may play a role at different stages of B cell differentiation. Further studies will be necessary to delineate the mechanisms underlying the differential response of each B cell subset to IL-27, and to investigate its possible role in B cell pathological conditions.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Prof. Yves Manach and the Department of Otorhinolaryngology of Necker Hospital for tonsils.

## FOOTNOTES

1. This work was supported by grant no. 3518 from the Association de Recherche contre le Cancer (to OD). FL was supported by a fellowship from CNRS/Assistance Publique-Hôpitaux de Paris.

2. These authors share first authorship

3 . Corresponding author :

Odile Devergne, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Bâtiment Sèvres, 161 rue de Sèvres, 75 015 Paris, France. Phone : 33 1 44 49 53 87 ; Fax : 33 1 44 49 06 76 ;

E.mail : [devergne@necker.fr](mailto:devergne@necker.fr)

4. Abbreviations used in this paper : EB13 : EBV-induced gene 3 ; GC : germinal center

## REFERENCES

- 1) Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, Birkenbach M. 1996. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol.* 70: 1143-1153.
- 2) Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity.* 16: 779-790.
- 3) Larousserie F, Pflanz S, Coulomb-L'Herminé A, Brousse N, Kastelein R, Devergne O. 2004. Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. *J Pathol.* 202: 164-171.
- 4) Larousserie F, Bardel E, Pflanz S, Arnulf B, Lome-Maldonado C, Hermine O, Brégaud L, Perennec M, Brousse N, Kastelein R, Devergne O. 2005. Analysis of interleukin-27 (EBI3/p28) expression in Epstein-Barr virus- and human T-cell leukemia virus type 1-associated lymphomas : heterogeneous expression of EBI3 subunit by tumoral cells. *Am J Pathol.* 166: 1217-1228.
- 5) Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. 2004. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol.* 172: 2225-2231.
- 6) Hunter CA, Villarino A, Artis D, Scott P. 2004. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol Rev.* 202: 106-114.

- 7) Hunter CA. 2005. New IL-12-family members : IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature Rev Immunol.* 5: 521-531.
- 8) Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. 2003. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol.* 170: 4886-489.
- 9) Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA. 2003. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res.* 23: 513-522.
- 10) Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ. 2003. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4<sup>+</sup> T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 15047-15052.
- 11) Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2004. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 173: 3871-3877.
- 12) Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A, Grewal IS, de Sauvage FJ. 2000. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature.* 407 :916-920.
- 13) Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Cowey T, Faggioni R, Mu S, Xia M, Wakeham AC, Nishina H, Potter J, Saris CJM, Mak TW. 2001. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity.* 15 : 569-578.



- 14) Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein RA, Saris C, Hunter CA. 2003. The IL-27R (WSX-1) Is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity*. 19:645-655.
- 15) Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. 2003. WSX-1 Is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity*. 19:657-667.
- 16) Pearl JE, Khader SA, Solache A, Gilmartin L, Ghilardi N, de Sauvage R, Cooper AM. 2004. IL-27 signaling compromises control of bacterial growth in mycobacteria-infected mice. *J Immunol*. 173 :7490-7496.
- 17) Bancroft AJ, Humphreys NE, Worthington JJ, Yoshida H, Grecis RK. 2004. WSX-1 : a key role in induction of chronic intestinal nematode infection. *J Immunol*. 172 :7635-7641.
- 18) Artis D, Johnson LM, Joyce K, Saris C, Villarino A, Hunter CA, Scott P. 2004. Cutting edge : Early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 172 :4672-4675.
- 19) Artis D, Villarino A, Silverman M, He W, Thornton EM, Mu S, Summer S, Covey TM, Huang E, Yoshida H, Koretzky G, Goldschmidt M, Wu GD, de Sauvage F, Miller HRP, Saris CJM, Scott P, Hunter CA. 2004. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol*. 173 :5626-5634.
- 20) Goldberg R, Wildbaum G, Zohar Y, Maor G, Karin N. 2004. Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol*. 173 :1171-1178.

- 21) Goldberg R, Zohar Y, Wildbaum G, Geron Y, Maor G, Karin N. 2004. Suppression of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol.* 173 :6465-6471.
- 22) Hölscher C, Hölscher A, Rückerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T, Saris C, Ehlers S. 2005. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol.* 174 :3534-3544.
- 23) Zahn S, Wirtz S, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF, von Stebut E. 2005. Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*. *Eur J Immunol.* 35 :1106-1112.
- 24) Yamanaka A, Hamano S, Miyazaki Y, Ishii K, Takeda A, Mak TW, Himeno K, Yoshimura A, Yoshida. 2004. Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol.* 172 :3590-3596.
- 25) Morishima N, Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2005. Augmentation of effector CD8<sup>+</sup> T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J Immunol.* 175 :1686-1693.
- 26) Hisada M, Kamiya S, Fujita K, Belladonna ML, Aoki T, Koyanagi Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2004. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res.* 64: 1152-1156.
- 27) Matsui M, Moriya O, Belladonna ML, Kamiya S, Lemonnier FA, Yoshimoto T, Akatsuka T. 2004. Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for induction of Hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice. *J Virol.* 78: 9093-9104.

- 28) Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, Back TC, Hixon JA, Hahn C, Shafer-Weaver K, Malyguine A, Kastelein R, Wigginton JM. 2004. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors : role for CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 173 :7170-7182.
- 29) Chiyo M, Shimozato O, Yu L, Kawamura K, Iizasa T, Fujisawa T, Tagawa M. 2005. Expression of IL-27 in murine carcinoma cells produces antitumor effects and induces protective immunity in inoculated hosts animals. *Int J Cancer.* 115 :437-442.
- 30) McLennan IC. 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 12:117-139.
- 31) McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG. 2001. Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol.* 8 :52-59.
- 32) Manser T. 2004. Textbook germinal centers ? *J Immunol.* 172:3369-3375.
- 33) Yoshimoto T, Okada K, Morishima N, Kamyia S, Owaki T, Asakawa M, Iwakura Y, Fukai F, Mizuguchi J. 2004. Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. *J Immunol.* 173:2479-2485.
- 34) Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J, Miljkovic V, Cattoretti G, Califano A, Dalla-Favera R. 2003. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 2639-2644.
- 35) Villarino AV, Larkin III J, Saris CJM, Caton AJ, Lucas S, Wong T, de Sauvage F, Hunter CA. 2005. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J Immunol.* 174: 7684-7691.

36) Airoidi I, Gri G, Marshall JD, Corcione A, Facchetti P, Guglielmino R, Trinchieri G, Pistoia V. 2000. Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *J Immunol.* 165:6880-6888.

37) Airoidi I, Di Carlo E, Banelli B, Moserle L, Cocco C, Pezzolo A, Sorrentino C, Rossi E, Romani M, Amadori A, Pistoia V. 2004. The IL-12R $\beta$ 2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies. *J Clin Invest.* 113 :1651-1659.

38) Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Hata K, Fukai F, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2005. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol.* 175 :2191-2200.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1 : Purification of human tonsillar B cell subsets**

Subsets of naive, GC, and memory B cells were purified from tonsillar B cells by a two-step magnetic separation, based on their differential surface expression levels of IgD and CD38, as described in the « material and methods » section. The purity of each fraction ( $\geq 95\%$ ), assessed by FACS analysis, is shown.

### **Figure 2 : Cell surface expression of IL-27R and gp130 on human tonsillar total B cells and B cell subsets**

Cell surface expression of IL-27R and gp130 was analyzed on purified tonsillar B cells by indirect staining and FACS analysis, before stimulation (day 0), or after a two-day stimulation with either anti-CD40 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) or anti- $\mu$  Abs (10  $\mu\text{g/ml}$ ). To identify the different B cell subsets, cells were also stained with anti-IgD-FITC and anti-CD38-PC5 mAbs, and gated on IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> naive B cells, IgD<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> GC B cells, or IgD<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> memory B cells. Staining with anti-IL-27R or anti-gp130 Abs is represented by a bold line, while staining observed with isotype control Abs is represented by a filled gray line (x axis : log fluorescence intensity ; y axis : cell number). One representative donor of 3 to 5 tested is shown. At day 2, anti- $\mu$ -stimulated GC B cells are not represented because of the very low number of surviving GC B cells.

### **Figure 3 : IL-27 induces STAT1 and STAT3 phosphorylation in human tonsillar B cells**

Purified total B cells (**A**, purity  $>98\%$ ) or B cell subsets (**B**, purity  $>95\%$  for each subset) were incubated for 15 min with RPMI 1640 containing 2% FBS in the absence (-) or presence of IL-27 (50 ng/ml). Cell lysates were then analyzed by western blot with anti-phosphoSTAT1 or anti-phosphoSTAT3 Abs. Blots were subsequently analyzed with anti-STAT1 and anti-STAT3 Abs to monitor STAT expression levels. Blots were also analyzed with anti-actin Ab to verify equal total protein loading (data not shown). Data shown are representative of 3 independent experiments performed on 2 to 3 different tonsils.

**Figure 4 : IL-27 induces T-bet expression in anti-CD40- or anti-Ig-stimulated naive and memory B cells**

Total B cells (**A**, purity >99%), or IgD<sup>+</sup> naive B cells and IgD<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> memory B cells (**B**, purity : ≥95% for naive B cells, and >97% for memory B cells) were stimulated for the indicated time (**A**) or for one day (**B**) with anti-CD40 (0.5 μg/ml) or anti-Ig (10 μg/ml) Abs, either alone (-) or in combination with IL-27 (50 ng/ml) (+). Nuclear extracts from cells before stimulation (lane 1) or after stimulation were subjected to western blot analysis for T-bet expression. In **A** (right blot), B cells were stimulated with anti-μ Ab. In **B** (right blot), naive B cells were stimulated with anti-μ Ab, while memory B cells were stimulated with a combination of anti-μ and anti-γ Abs. Data shown are representative of 4 different donors tested.

**Figure 5 : IL-27 induces IL-12Rβ2 expression in anti-μ-stimulated total and naive B cells, but not in anti-CD40-stimulated B cells**

Cell surface expression of IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 on purified tonsillar B cells was analyzed by indirect staining and FACS analysis. To identify the different B cell subsets, cells were stained with anti-IgD-FITC and anti-CD38-PC5 mAbs, and gated on IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> naive B cells, IgD<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> GC B cells, or IgD<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> memory B cells. In **A**, staining with anti-IL-12Rβ1 or anti-IL-12Rβ2 Abs observed before stimulation (day 0), or after a two-day stimulation with anti-CD40 (0.5 μg/ml) or anti-Ig Abs (anti-μ plus anti-γ Abs, 10 μg/ml) is represented by a bold line, while staining observed with isotype control Abs is represented by a filled gray line. In **B**, total B cells were stimulated for two days with anti-CD40 or anti-μ Abs, in the absence or in the presence of IL-27 (50 ng/ml). Staining observed in the absence of IL-27 is represented by a filled gray line, while staining observed in the presence of IL-27 is represented by a bold line. **A** and **B**, x axis : log fluorescence intensity ; y axis : cell number. In **A** and **B**, similar expression levels of IL-12Rβ1 and β2 were observed, whether cells were stimulated with anti-μ Ab or with anti-μ plus anti-γ Abs.

**Figure 6 : IL-27 upregulates CD54, CD86, and CD95 surface expression on anti- $\mu$ -stimulated naive and memory B cells**

Purified B cells were stimulated for two days with anti- $\mu$  Abs (10  $\mu$ g/ml) in the absence or presence of IL-27 (50 ng/ml), and were stained with PE-conjugated anti-CD54, anti-CD86, or anti-CD95 Abs, together with anti-IgD-FITC and anti-CD38-PC5 Abs. Staining observed in the absence of IL-27 is represented by a filled gray line, while staining observed in the presence of IL-27 is represented by a bold line. x axis : log fluorescence intensity ; y axis : cell number. Representative data of experiments performed using B cells from 6 different donors are shown.

**Figure 7 : Effects of IL-27 on B cell proliferation**

Purified total B cells (**A** and **B**, purity  $\geq 98,8\%$ ) or B cell subsets (**C** and **D**, purity  $\geq 95\%$ ) were stimulated for 3 days with anti- $\mu$  Ab, anti-CD40 Ab, or SAC particles at the concentrations indicated at the bottom of each figure (in  $\mu$ g/ml), in the absence or presence of IL-27 (50 ng/ml in **A**, **C**, **D** ; from 1 to 100 ng/ml in **B**). Results are means  $\pm$  SD of triplicates. In **B**, proliferation observed with anti- $\mu$  Ab alone is indicated by a triangle (mean : 4884 cpm). Experiments shown in **A**, **B**, **C** and **D** are independent experiments. In **C** and **D**, B cell subsets purified from the same tonsil were tested in parallel. Representative experiments of 3 to 12 experiments performed using B cells from 2 to 8 different donors are shown. No variation among donors was observed.

**Figure 1**

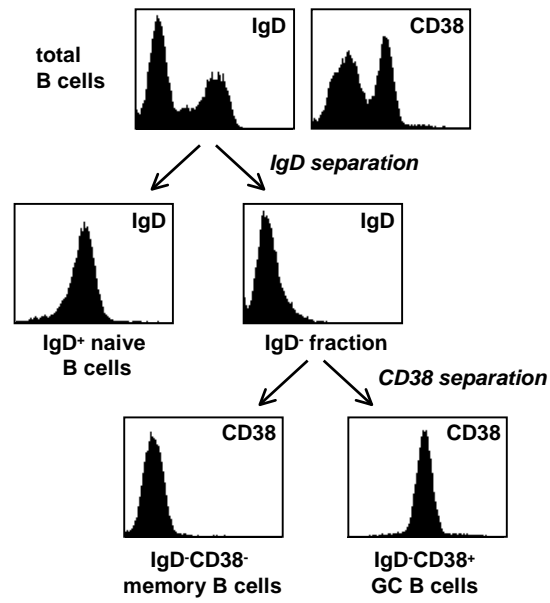




Figure 2

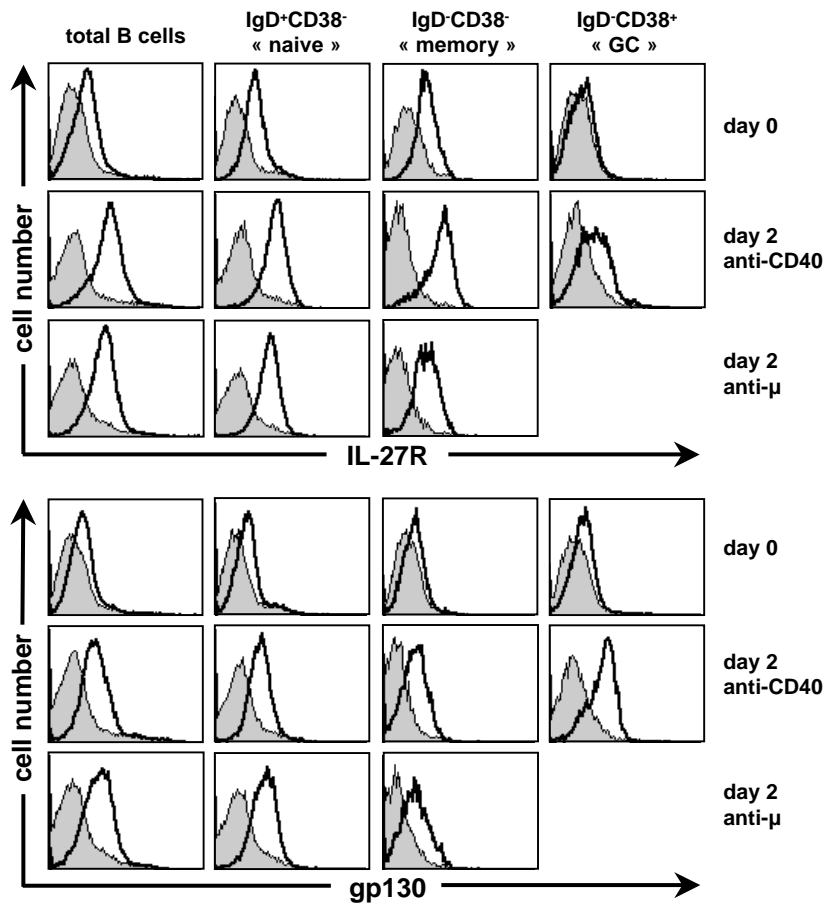


Figure 3

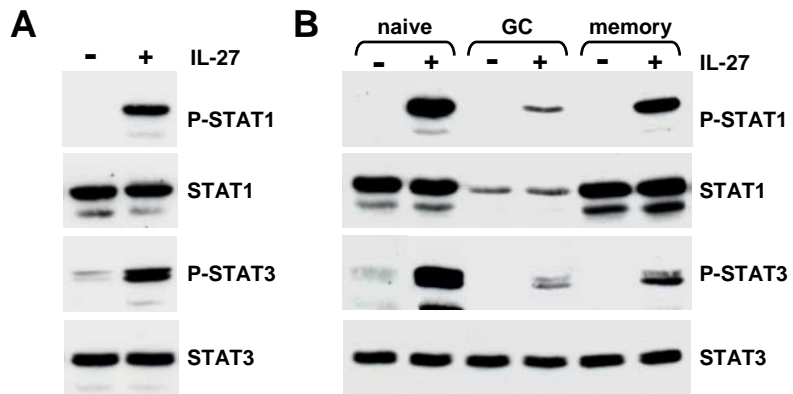


Figure 4

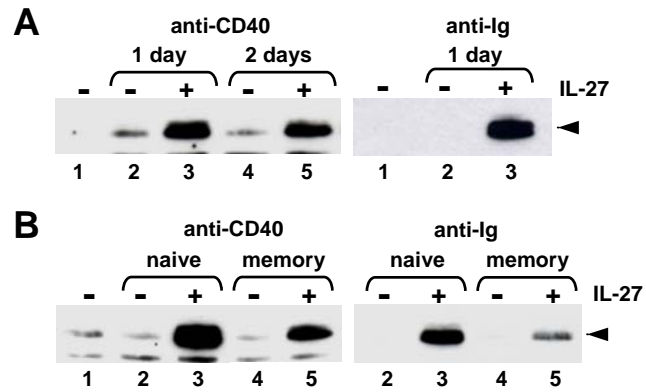


Figure 5

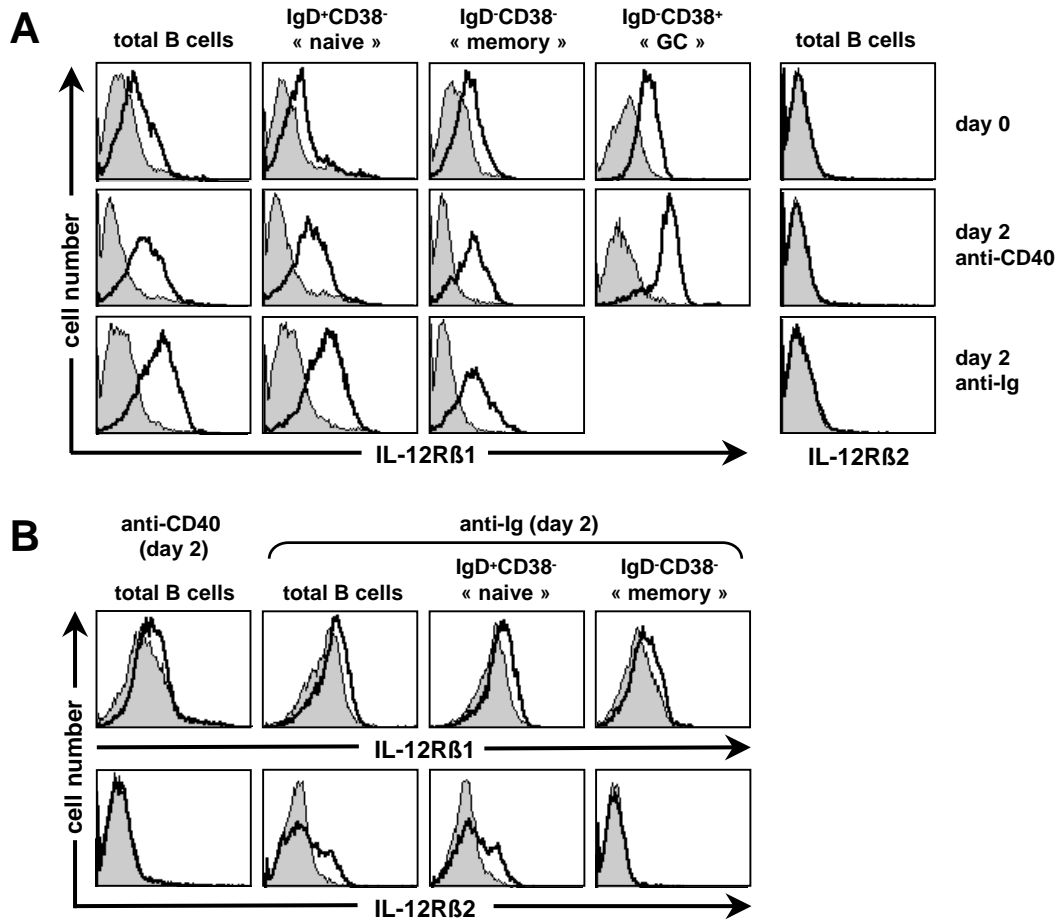


Figure 6

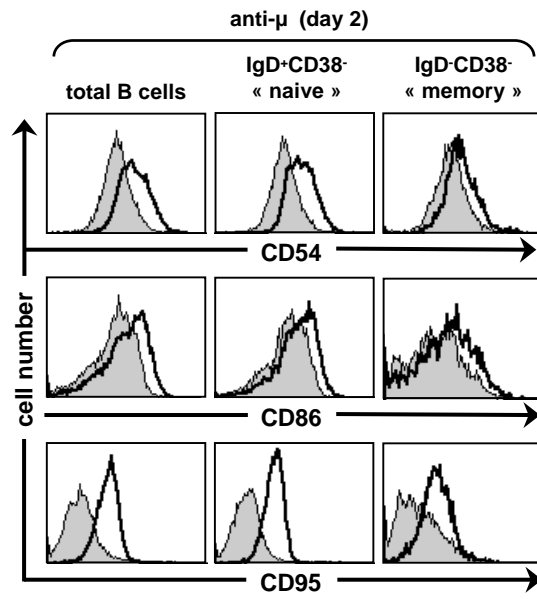
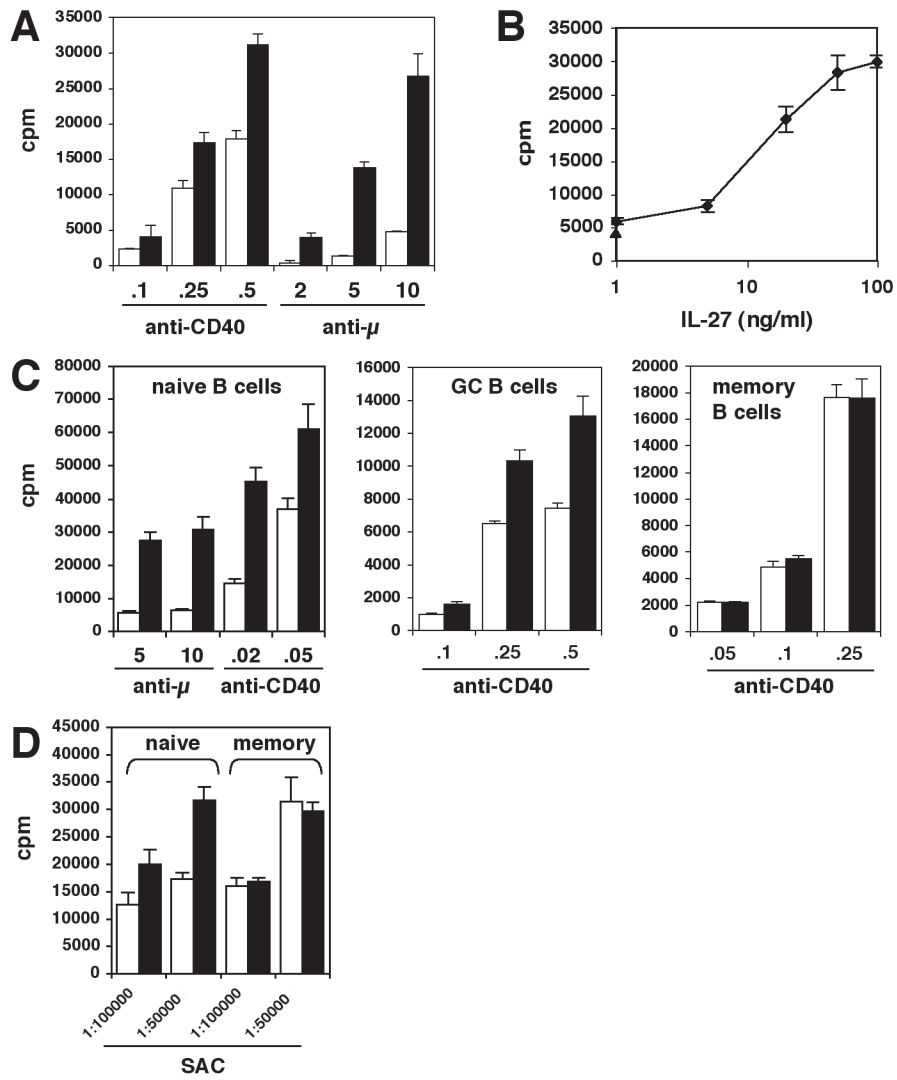


Figure 7



## **Variable expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 during normal B-cell differentiation and among B-cell lymphomas**

Short title: EB13 expression in B-cell lymphomas

Frédérique Larousserie <sup>1,2</sup>, Emilie Bardel <sup>1</sup>, Aurore Coulomb-L'Herminé <sup>3</sup>,  
Danielle Canioni <sup>2</sup>, Nicole Brousse <sup>2</sup>, Robert A. Kastelein <sup>4</sup>, Odile Devergne <sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR 8147, Université Paris V, Institut Fédératif de Recherche Necker, Paris, France

<sup>2</sup> UPRES EA 219, Service d'Anatomie Pathologique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

<sup>3</sup> Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Antoine Béclère, Clamart, France

<sup>4</sup> Schering-Plough Biopharma (formerly DNAX), Palo Alto, CA, USA

This work was supported by grant no. 3518 from the Association de Recherche contre le Cancer (to OD). FL was supported by a fellowship from CNRS/Assistance Publique-Hôpitaux de Paris.

There is no competing interest among co-authors. Sponsors were not involved in the study design and execution, or in the manuscript preparation.

**Word counts :** Abstract : 201 ; Main text : 2979

### **Corresponding author :**

Odile Devergne, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Bâtiment Sèvres, 161 rue de Sèvres, 75  
015 Paris, France. Phone : 33 1 44 49 53 87 ; Fax : 33 1 44 49 06 76 ;

E.mail : [devergne@necker.fr](mailto:devergne@necker.fr)

## **ABSTRACT**

Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene 3 (EBI3) is expressed by tumoral cells in several EBV-associated malignancies. It was recently found to associate with a novel peptide, p28, to form a new heterodimeric cytokine, termed interleukin-27. In this study, we investigated EBI3 and p28 expression in normal human B lymphocytes and in non EBV-associated B-cell lymphomas. Low levels of EBI3 were detected in purified tonsillar B cells, which were upregulated upon anti-CD40 or anti- $\mu$  stimulation via NF- $\kappa$ B activation. In nonneoplastic tissues, EBI3 expression by lymphocytes was largely restricted to a subset of germinal center (GC) B cells located at the margin of the light zone, in close contact with CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. Over 50% of EBI3<sup>+</sup> GC B cells were Ki67<sup>+</sup> proliferating blasts and 10-30% were engaged in plasma cell differentiation as shown by MUM1 expression. Immunohistochemical analysis of 64 B-cell lymphomas showed that highest levels of EBI3 were observed in follicular lymphomas and in diffuse large B-cell lymphomas of both GC B cell-like or non-GC B cell-like types. In both normal or tumoral B cells, no p28 expression was detected. This constitutive expression of EBI3 by tumoral B cells may be involved in lymphomagenesis, and may be a useful marker for lymphoma diagnosis.

**Keywords :** B-cell differentiation, B-cell lymphoma, cytokine, interleukin-27



## INTRODUCTION

Cytokines produced by tumoral cells or by the microenvironment are involved in the development of lymphomas by stimulating the growth of tumoral cells, altering the microenvironment or modulating the anti-tumoral immune response. Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene 3 (EBI3) is a protein related to the p40 subunit of interleukin(IL)-12, that was identified based on its induction by EBV infection in B lymphocytes (1). Recently, EBI3 was shown to associate with p28, an IL-12 p35 analogue, to form a new heterodimeric cytokine of the IL-12 family, termed IL-27 (2). IL-27 receptor complex comprises IL-27R (also called WSX-1 or TCCR) and gp130 (2,3). *In vitro* analyses and studies of IL-27R<sup>-/-</sup> or EBI3<sup>-/-</sup> mice have suggested that IL-27 acts both as a positive and negative regulator of T-cell and inflammatory responses (4-6).

*In vitro*, IL-27 is expressed primarily by activated monocytes and monocyte-derived dendritic cells (2). Consistent with these data, EBI3 and p28 were shown to be co-expressed *in situ* by macrophages and macrophage-derived cells in various lymphoid tissues, including involved tissues of Th1-associated granulomatous diseases (7,8). *In situ* expression of EBI3 was also detected in placental trophoblast cells, dendritic cells, endothelial cells and plasma cells, but not in normal T cells of lymphoid tissues (7-9). EBI3 expression by tumoral cells, in the absence of detectable p28 expression, has been reported in EBV- and HTLV-1-associated lymphomas (8,10).

We previously observed EBI3 expression by normal cells morphologically consistent with lymphoid blasts, possibly B cells (7,11). The expression profile of EBI3 and p28 in normal human B cells was unknown. Thus, in this study, we examined their expression in normal B cells, both in *in vitro* experiments and *in situ*. In parallel, we analyzed their expression in B-cell neoplastic counterparts, B-cell lymphomas.

## **METHODS**

### **Primary cell culture**

B cells were isolated from human tonsils obtained with informed consent from patients undergoing tonsillectomy at Necker Hospital. B cells were purified from tonsillar mononuclear cells isolated by Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) gradient centrifugation, by negative selection by depletion with CD2 microbeads (Miltenyi Biotec)(purity : >98% CD19<sup>+</sup>, <1% CD3<sup>+</sup>, and <1% CD14<sup>+</sup> as assessed by FACS analysis). In some experiments, B cell preparations were further depleted in macrophages by using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec) (purity : <0.01% CD68<sup>+</sup> macrophages). Purified B cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics (complete medium), and stimulated with goat F(ab')<sub>2</sub> anti- $\mu$  antibody (Jackson Laboratories, 10  $\mu$ g/ml) or goat polyclonal anti-CD40 antibody (R&D Systems, 0.5  $\mu$ g/ml), either alone or in combination with IL-4 (R&D Systems, 20 ng/ml). To purify monocytes, peripheral blood mononuclear cells were isolated from human blood by gradient centrifugation and subjected to positive selection using CD14 microbeads (purity >95%). Monocytes were cultured in complete medium in the presence of LPS (100 ng/ml, Sigma). BAY11-7082 was purchased from Calbiochem.

### **RNA extraction and RT-PCR analysis**

RNA was isolated by TRIzol (Invitrogen) extraction, followed by DNase I (Invitrogen) digestion and reverse transcription using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT) primer (Roche). For PCR analysis, the following primers were used : EBI3 5'-CCGAGCCAGGTACTACGTCC-3'(sense) and 5'-CCAGTCACTCAGTTCCCC GT-3' (antisense); p28 5'-GTCTCAGCCTGTTGCTGCTT-3' (sense) and 5'-GAA CCTCGGAGAGCAGCTT-3' (antisense);  $\beta$ 2-microglobulin 5'-CCAGCAGAGAAT GGAAAGTC-3' (sense) and 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3' (antisense). The thermal cycle profile was as follows: 1 min at 94°C, 30 sec at 55°C and 20 sec at 72°C, for 25 (EBI3), 32 (p28), and 30 ( $\beta$ 2-microglobulin) cycles.

### **Western blot analysis and ELISA**

Cell lysates and western blots were performed as previously described (8). Binding of mouse anti-EBI3 2G4H6 mAb (9) or goat anti-actin antibodies (Santa Cruz) was detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (Amersham Biosciences) or anti-goat antibodies (Santa Cruz) respectively, and chemiluminescence reagents (Pierce). IL-27 ELISA (detection limit, 0.3 ng/ml) was previously described (2). Culture supernatants of anti-CD40- or anti- $\mu$ -stimulated B cells ( $2 \times 10^6$  per ml, 2 to 3 day-stimulation) were concentrated using Amicon Ultra centrifugal filter unit (Millipore) before ELISA.

### **Tissues and immunohistochemistry**

Paraffin-embedded blocks of 64 B-cell lymphomas were analyzed. Lymphomas were classified according to the WHO classification. Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) were classified into germinal center (GC) B-cell-like (GCB) or non-GCB types, based on the differential immunodetection of CD10, Bcl6, and MUM1, as previously described (12). Nonneoplastic lymphoid tissues included 10 cases of reactive lymph nodes exhibiting follicular hyperplasia of unknown origin, 12 cases of tonsils and 8 cases of spleens. Tonsils were all LMP1<sup>-</sup> as assessed by immunohistochemistry. Lymphoma, lymph node and spleen tissues were collected for histological examination and diagnosis purpose and were studied in accordance with the French ethical law for studies on human tissues.

Single and double immunostainings were performed on fixed tissues as previously described (7,8). EBI3 was detected using 2G4H6 mouse mAb (IgG2a) at 2  $\mu$ g/ml, in parallel with an isotype-matched control mAb (RPC5, IgG2a, Cappel Durham). p28 was detected using affinity-purified rabbit polyclonal anti-p28 antibodies (DNAX) at 1-3  $\mu$ g/ml and normal rabbit IgG (Sigma) was used as a negative control. Other antibodies were obtained from commercial sources (Table 1).

## RESULTS

### **Analysis of EBI3 and p28 expression in *in vitro*-stimulated tonsillar B cells**

EBI3 and p28 gene expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR analysis in normal human B cells purified from tonsils. As positive controls, LPS-stimulated monocytes were studied (Fig.1A). Low levels of EBI3 mRNA were detected in unstimulated B cells, which were upregulated following 4 to 17 hrs of stimulation with anti-CD40 antibody and IL-4. In unstimulated monocytes, EBI3 mRNA levels were undetectable, but increased gradually following LPS stimulation. p28 mRNA levels were low in unstimulated monocytes and showed a transient but strong induction that peaked at 4 hrs of LPS stimulation. In contrast, no p28 message was detected in both unstimulated or stimulated B cells.

EBI3 expression by normal B cells was confirmed at the protein level. By western blot analysis, low levels of EBI3 were detected in the cell lysates of unstimulated tonsillar B cells, and these levels increased after surface Ig (anti- $\mu$  Ab) or anti-CD40 plus IL-4 stimulation (Fig.1B). Consistent with the lack of detectable p28 gene expression in B cells, no IL-27 could be detected by ELISA in the supernatant of anti-CD40- or anti- $\mu$ -stimulated B cells, even after a 30- fold concentration.

To assess the role of NF- $\kappa$ B in EBI3 induction mediated by anti-CD40 or anti- $\mu$  stimulation, BAY11-7082, an inhibitor of NF- $\kappa$ B, was added to the culture during stimulation. As shown in Fig.1C, addition of increasing amounts of BAY11-7082 (from 0.5  $\mu$ M to 5  $\mu$ M) resulted in dose-dependent decrease of EBI3 induction following anti-CD40 or anti- $\mu$  stimulation.

### **EBI3 is expressed at specific stages of normal B-cell differentiation**

In reactive lymph nodes and mucosa-associated lymphoid tissue, we previously observed strong EBI3 staining in cells with large activated nuclei and prominent nucleoli, morphologically consistent with lymphoid blasts (7,11). Similar data were observed in tonsils (n=11). EBI3<sup>+</sup> blast cells were mainly located within B follicles, but could also be found in extrafollicular areas (Fig.2). Within follicles, EBI3<sup>+</sup> blast cells showed a specific distribution

(Fig.2 a-c). They were rare in the mantle zone (naive B cells), absent from the dark zone (centroblasts), and were essentially detected in the light zone (centrocytes), particularly at its margin. In addition to strongly positive blast cells, some cleaved cells of medium size, typical of centrocytes, showed moderate EB13 staining (data not shown). To better characterize EB13<sup>+</sup> cells, double staining experiments were performed in lymph nodes (n=4 to 7) and tonsils (n=2). Coimmunostaining with anti-EB13 antibody, and either anti-CD3 or anti-CD20 antibodies, confirmed that EB13<sup>+</sup> cells present in GCs correspond to B and not T cells (Fig.2d and 2e). EB13/CD3 double staining also revealed that EB13<sup>+</sup> B cells were in close contact with CD3<sup>+</sup> T lymphocytes (Fig.2d). Over 50% of EB13<sup>+</sup> GC cells expressed Ki67, a marker of cell proliferation, and 10 to 30% expressed MUM1, a marker of plasma cell differentiation expressed by proliferating plasmablasts and by plasma cells (Fig.2f and g). Many of them were negative for Bcl6 (data not shown). The co-expression of Ki67 was surprising, given that Ki67 is classically considered to be expressed by centroblasts of the dark zone but not by centrocytes of the light zone. However, centrocytes at the margin of the light zone are engaged in cognate interaction with antigen-specific CD40L<sup>+</sup> activated T lymphocytes (13). This interaction leads to CD40 activation in the B cell, followed by NF-κB activation, proliferation, and differentiation into plasma cells or memory B cells. Thus, based on their location and immunophenotype and on our observation that EB13 expression is upregulated in B cells following CD40 activation, EB13<sup>+</sup> GC B cells most likely arise from CD40-stimulated centrocytes that engaged in cell proliferation and/or plasmablast differentiation.

Extrafollicular EB13<sup>+</sup> blast cells were shown by double staining experiments to stain for CD20, but not CD3, which confirmed they correspond to B cells (Fig.2m and n). They were also found to co-express Ki67 or MUM1 (Fig.2o and p). In addition, some EB13<sup>+</sup> plasma cells were observed, in particular in the tonsillar subepithelium.

To investigate EB13 expression in memory B cells, we performed immunostaining on spleens (n=8), where memory B cells are preferentially located in a specific compartment, the marginal zone (MZ). While many cells in the MZ stained positive for CD27, a marker of memory B cells, only few of them expressed EB13, suggesting that only a small fraction of memory B cells expressed EB13 (Fig.2h and i). These EB13<sup>+</sup> cells were of small to medium

size (Fig.2j) and were confirmed to be B cells by double staining with anti-EBI3 and anti-CD20 antibodies (n=3 cases) (Fig.2k). Some larger EBI3<sup>+</sup> cells in the MZ coexpressed MUM1 and may correspond to plasmablasts leaving the follicle and transiting through the MZ (data not shown).

p28 immunostaining performed in tonsils and spleens showed a signal in some GC cells exhibiting a plasmacytic differentiation and in a fraction of plasma cells in the tonsillar subepithelium. However, no p28 labelling of large blast cells was detected.

Besides B cells, other cell types stained with EBI3 or p28 antibodies. Macrophages and endothelial cells were weakly stained with anti-EBI3 and anti-p28 antibodies, while dendritic cells in the T cell areas of spleens and tonsils exhibited strong EBI3 staining, consistent with previous observations (7,8). In GCs, a diffuse EBI3 staining of the follicular dendritic cell network was occasionally observed. However, double staining with anti-EBI3 and CNA42 antibody (n=10), a follicular dendritic cell marker, indicated that most follicular dendritic cells do not express EBI3 (data not shown).

### **Variable expression of EBI3 in B-cell lymphomas**

Sixty-four B-cell lymphomas were analyzed by immunohistochemistry for EBI3 and p28 expression (Tables 2 and 3, and Fig.3). In mantle cell lymphoma (MCL) (n=6), less than 10% of tumoral cells were positive for EBI3. Similarly, no or low levels of EBI3 (<10% positive tumoral cells) were observed in small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia (SLL/CLL) (n=7), MZ lymphoma (MZL) (n=8), lymphoplasmacytic lymphoma (n=5), and plasma cell myeloma (n=5).

A different situation was observed in follicular lymphoma (FL) (n=11) and in DLBCL (n=22). In FL, the percentage of EBI3<sup>+</sup> tumoral cells was heterogeneous, ranging from <1% to 30% positive cells. Many EBI3<sup>+</sup> cells were large centroblast-like cells (Fig.3b), but some smaller centrocyte-like cells were also labelled. In DLBCL, even higher percentages of EBI3<sup>+</sup> tumoral cells were observed. Of 22 cases of DLBCL, 18 cases contained >30% EBI3<sup>+</sup> tumoral cells and 6 had >70% EBI3<sup>+</sup> cells. Based on gene profiling studies, two molecular forms of DLBCL have been defined. One, the GC B-like (GCB) form, is characterized by the

expression of genes normally expressed in GC B cells, while the second one, the non-GCB form (initially called « activated B cell-like » subtype) is characterized by the expression of genes normally induced during activation of peripheral blood B cells. The GCB form is associated with low NF- $\kappa$ B activation and a better survival, whereas the non-GCB form is associated with high NF- $\kappa$ B activation and a poor prognosis (14,15). Surprisingly, expression of EBI3 did not correlate with GCB or non-GCB subtypes, as determined by immunohistochemical detection of CD10, bcl-6 and MUM1 (Table 3), and did not correlate with the level of expression of each marker individually (data not shown).

In all lymphomas analyzed, no significant p28 staining of tumoral cells was observed. Regarding non tumoral cells, EBI3 and p28 staining was similar to the one observed in nonneoplastic lymphoid tissues.

## DISCUSSION

In this study, we show that EBI3 is expressed at specific stages of normal B-cell differentiation, which contrasts with the lack of detectable expression of EBI3 by normal T lymphocytes of human tissues (8). At early (naive B cells and centroblasts) or late (memory B cells) stages, no significant EBI3 expression was detected. Conversely, a subset of B cells in the light zone, in contact with CD3<sup>+</sup> T cells, strongly expressed EBI3. These cells, many of which are engaged in proliferation or in plasma cell differentiation, most likely derived from CD40-activated centrocytes. Indeed, EBI3 expression pattern in the GC appears to parallel that of CD40 signaling described by Basso *et al* (16). These authors analyzed in human tonsils downstream effectors of CD40 signaling, namely NF-κB activation and expression of two CD40-induced proteins, TRAF1 and JUNB, and found that most naive B cells of the mantle zone and all centroblasts of the dark zone showed no NF-κB activation, whereas a subset of centrocytes in the light zone was positive for NF-κB and expressed TRAF1 and JUNB. Interestingly, NF-κB<sup>+</sup> or JUNB<sup>+</sup> GC B cells were found to localize close to CD3<sup>+</sup> T cells, as we observed for EBI3<sup>+</sup> GC B cells.

EBI3 expression during plasma cell differentiation seems to be tightly regulated. Although EBI3 was expressed at early stages of plasma cell differentiation as shown by coexpression of MUM1 and EBI3 by GC plasmablasts, only a fraction of plasma cells was positive for EBI3, indicating that EBI3 expression may be lost upon terminal differentiation. EBI3<sup>+</sup>MUM1<sup>+</sup> extrafollicular B blasts were also observed. These cells may correspond to plasmablasts that exited the follicle, or alternatively may arise from activated B cells that proliferated and differentiated into low affinity plasmablasts outside the GC.

The present study also extends our knowledge on EBI3 expression profile in lymphomas. In T-cell lymphomas, we did not detect any significant tumoral cell expression of EBI3, with the exception of EBV- or HTLV-1-associated T-cell lymphomas (8). With regards to B-cell lymphomas, we previously showed that EBI3 was not expressed in EBV<sup>+</sup> Burkitt lymphomas, but was expressed by tumoral cells in both EBV<sup>+</sup> and EBV<sup>-</sup> Hodgkin lymphomas, and in LMP1<sup>+</sup> post-transplant lymphoproliferative disorders (8,10). We now



show that EB13 is also expressed by tumoral cells in non EBV-associated B-cell lymphomas, specially in FL and DLBCL. The heterogeneity in EB13 expression observed in B-cell lymphomas may be related to their stage of B-cell differentiation and presumed B-cell origin (17,18), as in most cases EB13 expression level was similar to the one observed in the normal B cell of supposed origin. Thus, MCLs, most of which derive from naive B cells, exhibited a relatively low level of EB13 expression, in accordance with the rare expression of EB13 by normal naive B cells. Similarly, MALT lymphomas that are thought to arise from MZ B-cells had low EB13 expression, consistent with the low level of EB13 expression observed in MZ B cells. B-cell CLL has been suggested to derive from either naive or memory B cells, two B-cell populations associated with rare EB13 expression.

Several types of lymphomas have been suggested to derive from GC B cells, including Burkitt lymphoma (BL), Hodgkin lymphoma, FL and DLBCL of GCB type. Among these, only BL, either EBV<sup>+</sup>(10) or EBV<sup>-</sup> (FL, unpublished data), are not associated with EB13 expression. EBV<sup>-</sup> and EBV<sup>+</sup> BL cells are thought to represent the transformed counterpart of centroblasts and memory B cells, respectively (19). Thus, the lack of EB13 expression by tumoral cells in EBV<sup>-</sup> and EBV<sup>+</sup> BL is consistent with the lack of EB13 expression by centroblasts and with its rare expression by memory B cells. Whether FL and GCB DLBCL arise from centroblasts or centrocytes or both has not been elucidated. In FLs, tumoral cells comprise both centrocyte- and centroblast-like cells. Centroblast-like cells are also observed in DLBCLs. However, although sharing morphological features with normal centroblasts, these cells may represent a distinct entity. First, normal centroblasts did not express EB13, which contrasts with the strong EB13 expression observed in tumoral centroblast-like cells in both follicular FL and DLBCL. Second, the specific distribution of EB13<sup>+</sup> centroblast-like cells observed in the cases of FL with abundant tumoral cells was reminiscent of that of EB13<sup>+</sup> blast cells in the light zone of normal follicles, in that centroblast-like cells were particularly abundant at the margin of neoplastic follicles.

Although EB13 expression in normal B cells is NF- $\kappa$ B dependent, no correlation was observed between EB13 expression levels and the GCB or non-GCB subtype of DLBCLs.

This suggests that EBI3 expression by DLBCL tumoral cells may not be related to NF- $\kappa$ B activation, but to activation of other signaling pathways.

In both normal B cells and B-cell lymphomas, there was not overlap between EBI3 and p28 staining, and we could not evidence detectable expression of p28 and IL-27 by normal B cells in *in vitro* experiments. These data questioned again for a possible role for EBI3 independently from its association to p28. This hypothesis is supported, not only by the dissociated expression profile of EBI3 and p28 observed in this study and in previous studies (2,8), but also by the discrepancy between the known functions for IL-27 and the phenotype of EBI3<sup>-/-</sup> mice (20). Free EBI3 has been suggested to act as an IL-27 antagonist to counteract the anti-tumoral role of IL-27 (21-23). EBI3 may also play a role, yet to be described, by associating with IL-12 p35 (24) or with an unidentified novel partner.

Although further studies will be needed to uncover the role of EBI3 in B-cell lymphomagenesis, its specific expression profile in B-cell lymphomas may constitute an additional useful marker for lymphoma classification, specially when limited tissue sample and few architectural data are available for pathological diagnosis.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Prof. Yves Manach and the Department of Otorhinolaryngology of Necker Hospital for tonsils, and the technicians from the Department of Pathology of Necker Hospital.

## REFERENCES

1. Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, Birkenbach M. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* 1996; **70**:1143-1153.
2. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 2002; **16**:779-790.
3. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 2004; **172**:2225-2231.
4. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003; **19**:641-644.
5. Hunter CA, Villarino A, Artis D, Scott P. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol Rev* 2004; **202**:106-114.
6. Hunter CA. New IL-12-family members : IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature Rev Immunol* 2005; **5**:521-531.
7. Larousserie F, Pflanz S, Coulomb-L'Herminé A, Brousse N, Kastelein R, Devergne O. Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. *J Pathol* 2004; **202**:164-171.

8. Larousserie F, Bardel E, Pflanz S, Arnulf B, Lome-Maldonado C, Hermine O, Brégaud L, Perennec M, Brousse N, Kastelein R, Devergne O. Analysis of interleukin-27 (EBI3/p28) expression in Epstein-Barr virus- and human T-cell leukemia virus type 1-associated lymphomas : heterogeneous expression of EBI3 subunit by tumoral cells. *Am J Pathol* 2005; **166**:1217-1228.
9. Devergne O, Coulomb-L'Herminé A, Capel F, Moussa M, Capron F. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pathol* 2001; **159**:1763-1776.
10. Niedobitek G, Pazolt D, Teichmann M, Devergne O. Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EBI3, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 2002; **198**:310-316.
11. Gehlert T, Devergne O, Niedobitek G. Epstein-Barr virus (EBV) infection and expression of the interleukin-12 family member EBV-induced gene 3 (*EBI3*) in chronic inflammatory bowel disease. *J Med Virol* 2004; **73**:432-438.
12. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; **103**:275-282.
13. Casamayor-Palleja M, Khan M, MacLennan ICM. A subset of CD4<sup>+</sup> memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J Exp Med* 1995; **181**:1293-1301.

14. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; **403**:503-511.
15. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor  $\kappa$ B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001; **194**:1861-1874.
16. Basso K, Klein U, Niu H, Stolovitzky GA, Tu Y, Califano A, Cattoretti G, Dalla-Favera R. Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood* 2004; **104**:4088-4096.
17. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies : the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**:920-932.
18. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**:251-262.
19. Bellan C, Lazzi S, Hummel M, Palumbo N, de Santi M, Amato T, Nyagol J, Sabattini E, Lazure T, Pileri SA, Raphael M, Stein H, Tosi P, Leoncini L. Immunoglobulin gene analysis reveals two distinct cells of origin for EBV positive and EBV negative Burkitt's lymphomas. *Blood*. 2005; **106**:1031-1036.
20. Nieuwenhuis EE, Neurath MF, Corazza N, Iijima H, Trgovcich J, Wirtz S, Glickman J, Bailey D, Yoshida M, Galle PR, Kronenberg M, Birkenbach M, Blumberg RS.

Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:16951-16956.

21. Hisada M, Kamiya S, Fujita K, Belladonna ML, Aoki T, Koyanagi Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res* 2004; **64**:1152-1156.
22. Matsui M, Moriya O, Belladonna ML, Kamiya S, Lemonnier FA, Yoshimoto T, Akatsuka T. Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for induction of Hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice. *J Virol* 2004; **78**:9093-9104.
23. Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, Back TC, Hixon JA, Hahn C, Shafer-Weaver K, Malyguine A, Kastelein R, Wigginton JM. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors : role for CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004; **173**:7170-7182.
24. Devergne O, Birkenbach M, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:12041-12046.

**Table 1 : Commercial antibodies used for immunohistochemistry**

<b>Specificity</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution or concentration</b>	<b>Source</b>
CD3	F7.2.38, mouse IgG1	10 µg/ml	DakoCytomation
CD10	56C6, mouse IgG1	1:50	Novocastra Laboratories Ltd
CD20	L26, mouse IgG2a	2.3 µg/ml	DakoCytomation
CD27	137B4, mouse IgG1	1:20	Novocastra Laboratories Ltd
Bcl-6	PG-B6p, mouse IgG1	20 µg/ml	DakoCytomation
Ki67	MIB-1, mouse IgG1	0.4 to 1.6 µg/ml	DakoCytomation
LMP1	CS1-4, mouse IgG1	4 µg/ml	DakoCytomation
FDC	CNA42, mouse IgM	1.4 µg/ml	DakoCytomation
MUM1	M17 polyclonal goat IgG	0.2 µg/ml	Santa Cruz

FDC: follicular dendritic cell



**Table 2 : Immunohistochemical analysis of EB13 and p28 expression in pre- or post-GC derived B-cell lymphomas.**

Case no.	Diagnosis	% of positive tumoral cells	
		EB13	p28
1	MCL	<10%	-
2	MCL	<10%	-
3	MCL	<10%	-
4	MCL	-	-
5	MCL	<10%	-
6	MCL	-	-
7	SLL	-	-
8	SLL	-	ND
9	CLL	<10%	-
10	CLL	-	ND
11	CLL	-	-
12	CLL	-	-
13	CLL	-	-
14	MALT lymphoma	<10%	-
15	MALT lymphoma	<10%	-
16	MALT lymphoma	<10%	-
17	MALT lymphoma	-	-
18	MALT lymphoma	<10%	-
19	MALT lymphoma	-	ND
20	nodal MZL	<10%	-
21	splenic MZL	<10%	-
22	lymphoplasmacytic lymphoma	-	ND
23	lymphoplasmacytic lymphoma	-	ND
24	lymphoplasmacytic lymphoma	-	ND
25	lymphoplasmacytic lymphoma	<10%	ND
26	lymphoplasmacytic lymphoma	-	ND
27	plasma cell myeloma	-	ND
28	plasma cell myeloma	-	ND
29	plasma cell myeloma	-	ND
30	plasma cell myeloma	-	ND
31	plasma cell myeloma	-	ND

- : <1% positive cells

MALT lymphoma : extranodal MZL of the mucosa-associated lymphoid tissue ;

ND : not done

**Table 3 : Immunohistochemical analysis of EB13 and p28 expression in FL and DLBCL**

Case no.	Diagnosis	% of positive tumoral cells	
		EB13	p28
1	FL	++	-
2	FL	++	-
3	FL	-	ND
4	FL	++	-
5	FL	++	-
6	FL	+	-
7	FL	+	-
8	FL	++	-
9	FL	+	-
10	FL	+	-
11	FL	++	-
12	DLBCL, non-GCB	+	-
13	DLBCL, GCB	++++	-
14	DLBCL, non-GCB	++++	-
15	DLBCL, non-GCB	++++	-
16	DLBCL, GCB	+++	-
17	DLBCL, non-GCB	-	-
18	DLBCL, non-GCB	+++	-
19	DLBCL, GCB	+++	-
20	DLBCL, non-GCB	+++	-
21	DLBCL, non-GCB	++++	-
22	DLBCL, non-GCB	+++	-
23	DLBCL, non-GCB	+++	-
24	DLBCL, GCB	+	ND
25	DLBCL, non-GCB	+++	-
26	DLBCL, non-GCB	+++	-
27	DLBCLn non-GCB	+++	-
28	DLBCL, GCB	+++	-
29	DLBCL, non-GCB	++++	-
30	DLBCL, GCB	+	-
31	DLBCL, non-GCB	++++	-
32	DLBCL, non-GCB	+++	-
33	DLBCL, GCB	+++	-

- : <1% positive cells ; + : 1 to <10% positive cells ; ++ : 10 to 30% positive cells ; +++ : >30 to <70% positive cells ; ++++ : >70% positive cells ; ND : not done  
DLBCL were classified as GCB or non-GCB as described in ref.<sup>12</sup>.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1 : Immunoblot analysis of EBI3 expression in *in vitro* stimulated human tonsillar B cells

**A:** Gene expression of EBI3, p28, and  $\beta 2$  microglobulin ( $\beta 2m$ ) was analyzed by semi-quantitative RT-PCR from purified monocytes (purity : >95%) or B cells (purity : 99%), either before stimulation, or after stimulation for 4 and 17 hrs with LPS or anti-CD40 antibodies plus IL-4, respectively.  $\beta 2$ -microglobulin was used as an internal control for equal material in each condition.

**B :** Cell lysates (15  $\mu$ g per lane) from purified tonsillar B cells (purity : 99%), either unstimulated (d0) or stimulated for 2 days with anti-CD40 antibodies plus IL-4, or with anti- $\mu$  antibodies were analyzed by immunoblotting with anti-EBI3 antibodies.

**C :** Purified tonsillar B cells (purity : >99%) were left unstimulated (d0) or were stimulated with anti-CD40 antibodies (lanes 2-6) or anti- $\mu$  antibodies (7-11) in the presence of increasing concentrations (indicated at the top of the blot in  $\mu$ M) of BAY11-7082. After 24 hrs, cells were lysed and cell lysates (25  $\mu$ g/lane) were analyzed by western blot for EBI3 or for actin as control for equal protein loading.

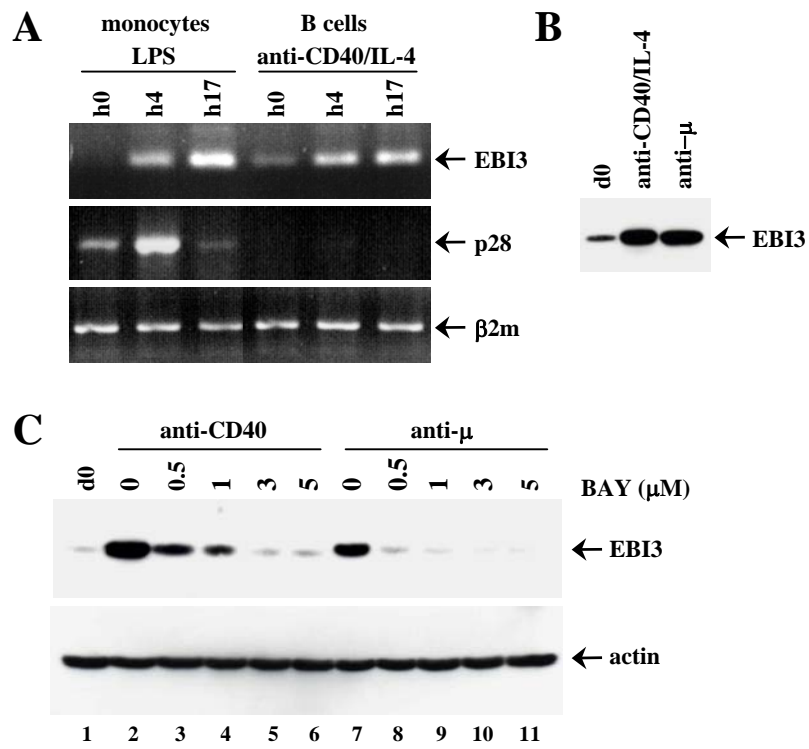
### Figure 2 : Immunohistochemical analysis of EBI3 expression in nonneoplastic lymphoid tissues

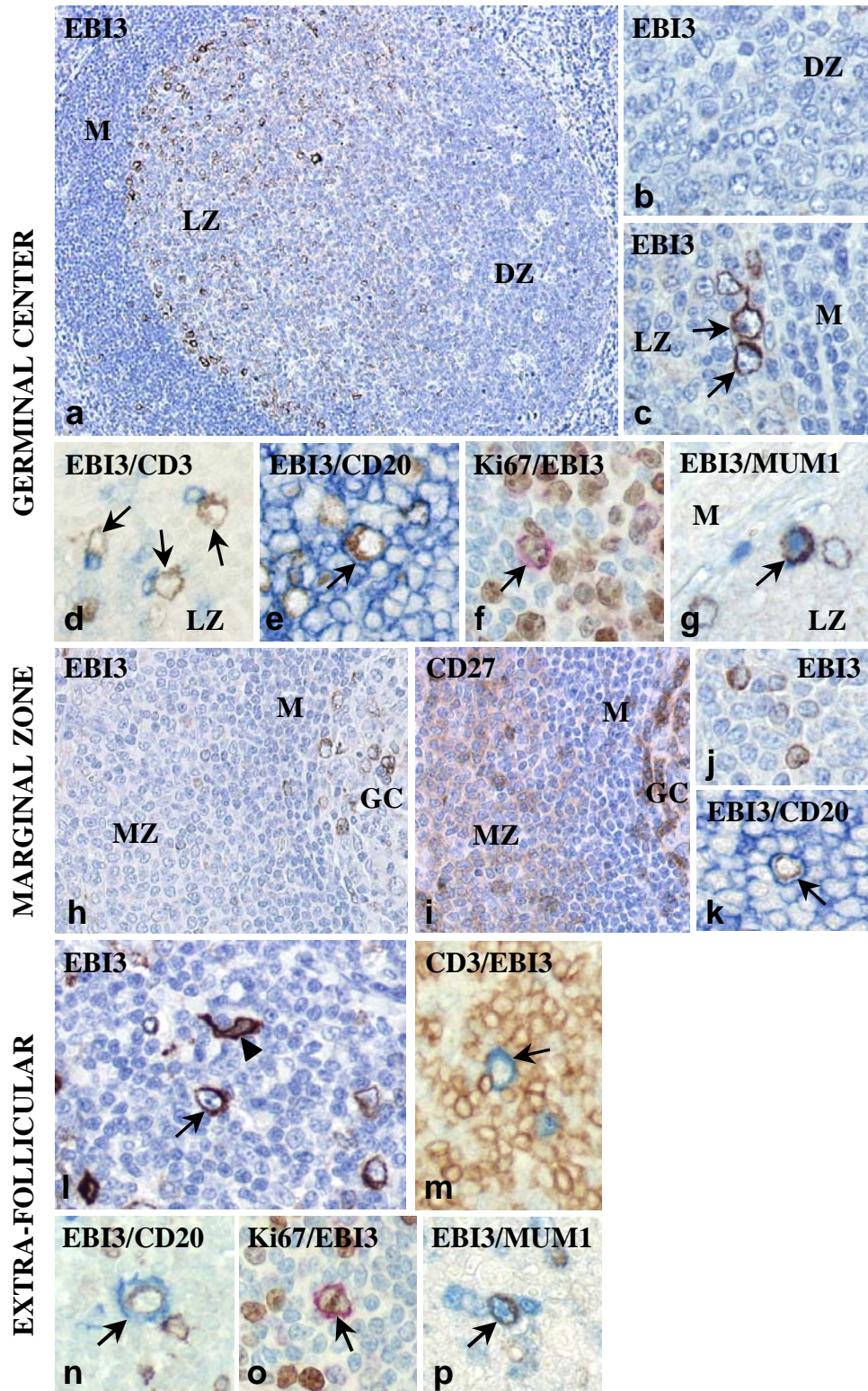
Sections from human tonsils (**a-c, l, p**), lymph nodes (**d, f, g, m-o**) or spleens (**e, h-k**) were analyzed by single or double immunostaining as indicated at the top of each figure. As indicated on the left of the figure, tissue sections shown correspond to germinal centers in **a-g**, spleen marginal zones in **h-k**, and extrafollicular areas in **l-p**. In **a**, low magnification of a polarized follicle shows that most EBI3<sup>+</sup> cells are located at the margin of the light zone. Higher magnification of representative examples of dark zone and of light zone, are shown in **b** and **c**, respectively. On **c**, EBI3<sup>+</sup> cells with large activated nuclei and prominent nucleoli, morphologically consistent with lymphoid blasts, are indicated by arrows. In contrast, centroblasts of the dark zone on **b** are all negative for EBI3. On **d**, EBI3<sup>+</sup> large blast cells (in brown) in contact with CD3<sup>+</sup> T lymphocytes (in blue) are indicated by arrows. On **e, k** and **n**,

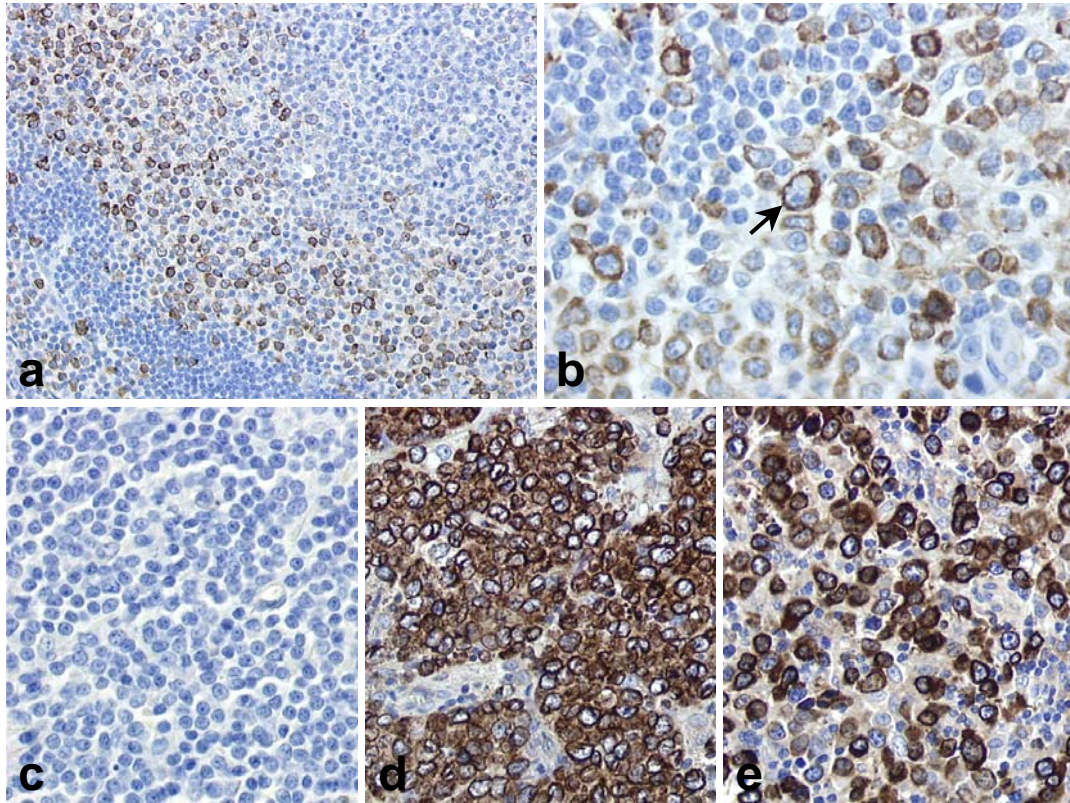
an EB13<sup>+</sup> cell (in brown) costaining with CD20 (in blue) is indicated by an arrow. On **f** and **o**, a cell coexpressing Ki67 (in brown) and EB13 (in red) is shown, while in **g** and **p**, a cell positive for both MUM1 (in blue) and EB13 (in brown) is indicated. **h** and **i** are serial sections of spleen stained with anti-EB13 or anti-CD27 antibodies, respectively. Anti-CD27 antibody stained strongly activated T cells in the germinal center and in the marginal zone, and stained moderately memory B cells of the marginal zone. On **l**, an arrow indicates a blast cell positive for EB13, while an arrow head indicates an EB13<sup>+</sup> cell morphologically consistent with a dendritic cell. On **m**, a large blast cell positive for EB13 (in blue), but negative for CD3 (in brown) is indicated by an arrow. In all cases, no signal was observed with control antibodies used in parallel. In single staining experiments (**a-c,h-j,l**), slides were counterstained with Harris hematoxylin. In double staining experiments, slides were counterstained with methyl green (**d,e,g,k,m,n,p**) or hematoxylin (**f,o**). DZ : dark zone, LZ : light zone, M : mantle zone, MZ : marginal zone. Objectives : X 10 in **a** ; X 40 in **b-g**, and **j-p**; X 20 in **h** and **i**.

### **Figure 3 : Immunohistochemical analysis of EB13 expression in B-cell lymphomas**

Sections from cases of FL (**a** and **b**), of MCL (**c**), or of DLBCL of the «GCB» type (**d**) or «non-GCB» type (**e**) were analyzed by immunohistochemistry with anti-EB13 antibodies. Note in **a**, the specific distribution of EB13<sup>+</sup> tumoral cells which predominate at the margin of the neoplastic follicle. On **b**, a centroblast-like cell positive for EB13 is indicated by an arrow. In all cases, no signal was observed with control antibodies used in parallel. Slides were counterstained with Harris hematoxylin. Objectives : X 10 in **a** ; X 40 in **b** ; X 20 in **c-e**.







# **DISCUSSION**



### ➤ Etude du profil d'expression d'EBI3 et de p28 *in situ* chez l'Homme

Nos travaux sont les seuls publiés à l'heure actuelle concernant le profil d'expression des deux sous-unités de l'IL-27 *in situ* dans des tissus humains normaux et pathologiques. En effet, lorsque nous avons initié cette étude, il n'y avait aucun outil disponible dans le commerce pour étudier l'expression ou la fonction de l'IL-27, chez l'Homme ou la Souris. Les autres études sur l'expression de l'IL-27, publiées pendant que notre étude était en cours, sont des études réalisées par RT-PCR, le plus souvent à partir de tissus totaux de Souris.

*EBI3 et p28 sont co-exprimées in situ dans les tissus lymphoïdes humains par plusieurs types cellulaires, principalement les cellules de la lignée macrophagique.*

Nous avons détecté les deux sous-unités de l'IL-27, par immunohistochimie sur des coupes tissulaires sériées, dans les macrophages des sinus ganglionnaires, les macrophages tissulaires ainsi que dans les cellules épithélioïdes et les cellules géantes des granulomes de granulomatoses associées à une réponse Th1. Ces résultats *in vivo* étaient en accord avec les études *in vitro* qui montraient la co-expression des transcrits des deux sous-unités de l'IL-27 dans les monocytes humains activés par le LPS (Pflanz, Immunity 2002). Parmi les cellules de la lignée macrophagique, il est intéressant de noter que les macrophages à corps tingibles du CG n'expriment pas EBI3 ni p28.

Nous avons également détecté les deux sous-unités de l'IL-27 dans les cellules endothéliales et les plasmocytes. Comme c'est le cas pour les macrophages, cette expression n'était pas observée dans tous les cas, suggérant une régulation de l'expression de l'IL-27 dans ces types cellulaires.

*Seule la sous-unité EBI3, et non p28, est détectée in situ dans les cellules dendritiques des tissus lymphoïdes humains.*

Dans différents tissus lymphoïdes humains, nous avons observé *in situ* un marquage intense des cellules dendritiques par l'anticorps anti-EBI3, sans détecter p28 dans ces cellules. Ce résultat était inattendu au vu des résultats obtenus *in vitro* dans les cellules dendritiques

humaines dérivées de monocytes du sang périphérique. En effet, ces cellules co-expriment les transcrits des deux sous-unités de l'IL-27, et sécrètent l'hétérodimère après activation par le LPS (Pflanz, Immunity 2002). En particulier, en ce qui concerne *p28*, son niveau d'expression dans ces cellules est comparable à celui observé dans les monocytes humains activés *in vitro*.

Plusieurs éléments peuvent expliquer l'absence de détection de *p28* dans les cellules dendritiques *in situ*. Un premier élément de réponse est apporté par les études *in vitro* de la cinétique des transcrits. Dans les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes *in vitro* et activées par le LPS, les cinétiques d'expression des transcrits d'*EBI3* et de *p28* ne se superposent pas, l'expression de *p28* étant beaucoup plus transitoire que celle d'*EBI3*. L'expression de *p28* est maximale précocement, après seulement 3 à 6 heures de stimulation, et devient indétectable 24 heures après stimulation, alors que l'expression d'*EBI3* est maximale plus tardivement et décroît plus lentement, avec un niveau d'expression encore significatif à 72 heures (Pflanz, Immunity 2002). Dans l'hypothèse où les cellules dendritiques présenteraient *in vivo* une cinétique d'expression comparable à celle observée *in vitro*, l'expression très transitoire du transcrite de *p28* pourrait aboutir à de faibles quantités intracellulaires de la protéine *p28*, sous le seuil de détection de notre technique d'immunohistochimie. Toutefois, dans les monocytes activés *in vitro* par le LPS, nous observons également une expression transitoire de *p28*, et nous sommes capables de détecter *p28 in situ* par immunohistochimie dans les macrophages.

Un deuxième élément à prendre en compte est l'origine des cellules dendritiques et la nature des stimuli. En ce qui concerne l'IL-12, il a été montré qu'en fonction de leur mode d'obtention et de leur mode d'activation, les cellules dendritiques produisent des quantités variables d'IL-12. En particulier, il a été montré que les cytokines utilisées pour générer des cellules dendritiques *in vitro*, en particulier l'IL-4, modulent l'expression des gènes *p35* et *p40* (Trinchieri, Nat Rev Immunol 2003).

De même pour l'IL-23, les transcrits *p40* et *p19* sont exprimés à des niveaux variables selon l'origine des cellules dendritiques. Alors que les cellules dendritiques dérivées de monocytes *in vitro* co-expriment *p40* et *p19*, les cellules dendritiques fraîchement isolées de la moelle osseuse ou de la rate, et les cellules dendritiques dérivées *in vitro* à partir de cellules

de moelle osseuse, n'expriment que le transcrite de *p40* et non celui de *p19* (Oppmann, Immunity 2000).

Sur la base de ces résultats, il est envisageable que les cellules dendritiques des tissus lymphoïdes humains produisent moins de p28 (et d'IL-27) *in vivo* que les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains *in vitro*. Des résultats du laboratoire suggèrent que l'IL-4, présente lors de la maturation des cellules dendritiques *in vitro*, pourrait augmenter l'expression de p28. Un travail collaboratif entre Gijs van Seventer et Odile Devergne a montré que les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes du sang périphérique et cultivées en présence de fortes concentrations d'IL-4 produisent des quantités d'IL-27 détectables par ELISA dans le surnageant de culture (Nagai, J Immunol 2003). A l'inverse, l'IL-27 n'a pu être détectée dans le surnageant de culture de cellules dendritiques dérivées de monocytes en présence de plus faibles quantités d'IL-4 (Odile Devergne, résultats non publiés). Bien qu'il ne soit pas possible de tirer de conclusions définitives sur ces résultats, car les cellules dendritiques avaient été générées indépendamment dans deux laboratoires différents, il est envisageable que l'IL-4 affecte le niveau d'expression de p28. Il serait intéressant de refaire ces expériences en parallèle dans le même laboratoire afin de valider ces résultats et d'établir le rôle potentiel de l'IL-4 dans la régulation de l'expression de l'IL-27 par les cellules dendritiques.

#### *L'expression d'EBI3 par les cellules tumorales est spécifique de certains lymphomes.*

Nous avons observé l'expression d'EBI3 *in situ* dans de nombreuses cellules lymphocytaires tumorales : essentiellement dans les lymphoproliférations EBV<sup>+</sup> LMP1<sup>+</sup>, dans certains cas d'ATL et certains types de lymphomes B. L'expression d'EBI3 par les cellules tumorales paraît spécifique aux lymphomes : en effet, nous n'avons pas détecté d'expression d'EBI3 par les cellules tumorales dans un panel de différentes tumeurs malignes comprenant des carcinomes d'origine tissulaire variée (sein, ovaire, endomètre, prostate, vessie, rein, bronches, thyroïde, tube digestif, n=34), des tumeurs germinales testiculaires (n=7) et des tumeurs pédiatriques (n=20), dont des sarcomes (résultats non publiés).

Dans les lymphocytes tumoraux exprimant EB13, nous n'avons pas détecté p28. L'absence de détection de p28 *in situ* dans ces lymphocytes tumoraux n'est probablement pas due à un manque de sensibilité de la technique d'immunohistochimie sur ces tissus, étant donné que d'autres types cellulaires au sein de la tumeur, comme les macrophages ou les cellules endothéliales, étaient marqués avec les anticorps anti-p28. On ne peut cependant éliminer la possibilité d'une production de la protéine p28 à des niveaux faibles et de façon transitoire.

Les lymphomes B présentant la plus forte proportion de cellules tumorales exprimant EB13 sont les lymphomes folliculaires, les lymphomes B diffus à grandes cellules et les lymphomes de Hodgkin. Ces lymphomes, à l'exception des lymphomes B diffus à grandes cellules non « germinal center B-cell like », dérivent d'une cellule B du CG. A l'inverse, les lymphomes de Burkitt EBV<sup>-</sup>, qui sont supposés dériver d'une cellule B du CG précoce au stade du centroblaste, n'expriment pas EB13. Ces résultats sont à rapprocher des résultats obtenus *in situ* dans les lymphocytes B normaux. Nous n'avons pas détecté EB13 dans les centroblastes de la zone sombre du CG. Les cellules EB13<sup>+</sup> sont majoritairement situées dans la zone claire et pourraient correspondre à des cellules B du CG tardives, au stade de centrocyte activé ou de plasmablaste. L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression d'EB13 serait maintenue dans les cellules tumorales de certains lymphomes B, en rapport avec le stade de différenciation de la cellule B normale d'origine du lymphome. Ainsi, la mise en évidence de l'expression d'EB13 pourrait être utile comme marqueur de l'origine d'une cellule B du CG tardive et pourrait être intéressante dans deux diagnostics différentiels : lymphome de Burkitt vs lymphome B diffus à grandes cellules, et lymphome de Hodgkin vs lymphome anaplasique à grandes cellules. Il est néanmoins nécessaire d'étudier un plus grand nombre de cas pour valider EB13 comme marqueur diagnostique.

L'absence de corrélation entre le niveau d'expression d'EB13 par les cellules tumorales et le sous-type « activated B-cell like » ou « germinal center B-cell like » des lymphomes B diffus à grandes cellules nous a paru surprenante dans un premier temps, étant donné que nous avons montré que l'expression d'EB13 est dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules B humaines d'amygdales activées *in vitro* via CD40 ou le BCR. Ces

résultats suggèrent que d'autres mécanismes que l'activation de NF- $\kappa$ B sont impliqués dans la production d'EBI3 par les cellules tumorales dans ces lymphomes.

*EBI3 n'est pas détectée in situ dans les lymphocytes T humains normaux ni dans les lymphomes T non associés à l'EBV ou à l'HTLV-1.*

L'analyse *in situ* par double marquage a montré que les lymphocytes T normaux humains des tissus lymphoïdes n'expriment pas EBI3. Nous avons également montré que les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> purifiés à partir du sang périphérique n'expriment pas EBI3 en l'absence de stimulation et l'expriment à un niveau très faible après activation par la PHA et l'IL-2 *in vitro*. Dans les lymphomes T non associés aux virus transformants EBV ou HTLV-1, nous avons observé *in situ* une expression d'EBI3 rare ou nulle par les cellules T tumorales. Ces résultats suggèrent que l'expression d'EBI3 par les cellules T tumorales relève de mécanismes d'induction spécifiques aux virus transformants.

#### ► Un rôle pour EBI3 indépendamment de son association à p28 ?

L'expression forte d'EBI3 par certains types cellulaires comme les cellules tumorales lymphomateuses ou les lymphocytes B, en l'absence de quantités détectables de p28, suggère qu'EBI3 pourrait jouer un rôle indépendamment de son association à p28.

#### *Association d'EBI3 à un autre partenaire que p28 ?*

La participation d'une même sous-unité à la formation de différentes cytokines hétérodimériques est une des caractéristiques des cytokines de la famille de l'IL-6/IL-12. Une hypothèse est qu'EBI3 pourrait s'associer à un ligand de cette famille, connu ou encore inconnu, autre que p28. Odile Devergne a montré par des expériences de co-transfection *in vitro*, qu'EBI3 s'associe à la chaîne p35 de l'IL-12 et que la co-expression des deux sous-unités dans une même cellule facilite leur sécrétion (Devergne, Proc Natl Acad Sci USA 1997). Cette association d'EBI3 et de p35 a été mise en évidence *in vivo* par co-immunoprécipitation à partir d'extraits tissulaires de placenta humain (Devergne, Proc Natl Acad Sci USA 1997) et l'expression d'EBI3 et de p35 par des types cellulaires communs, le

syncytiotrophoblaste et trophoblaste extra-villeux, a été montrée *in situ* par immunohistochimie sur coupes sériées de placenta humain (Devergne, Am J Pathol 2001). Le rôle de l'hétérodimère EBI3p35 n'est actuellement pas connu. En effet, les premières études visant à définir le rôle de cet hétérodimère ont été freinées par la difficulté de produire celui-ci sous forme stable et pure, en l'absence des formes p35 et EBI3 libres. Une protéine de fusion EBI3p35 a récemment été générée en collaboration avec le laboratoire d'Hugues Gascan (unité INSERM 564, Angers), ce qui nous permet de disposer aujourd'hui d'un outil plus performant pour étudier les effets de cet hétérodimère. Par ailleurs, la recherche de nouveaux partenaires pour EBI3, autres que p35 et p28, est en cours en collaboration avec le laboratoire d'Hugues Gascan.

Les résultats obtenus par différentes équipes avec les souris IL-27R<sup>-/-</sup> et EBI3<sup>-/-</sup> suggèrent également qu'EBI3 puisse s'associer un autre partenaire que p28. D'une part, le phénotype des souris EBI3<sup>-/-</sup> ne peut entièrement s'expliquer par les effets connus de l'IL-27. En effet, alors qu'*in vitro*, l'IL-27 présente des effets pro-Th1 (et anti-Th2 via l'inhibition de l'expression de GATA-3), ces souris présentent un défaut de réponse Th2 dans un modèle de colite induite par l'oxazolone (Nieuwenhuis, Proc Natl Acad Sci USA 2002). D'autre part, la dualité des résultats obtenus avec les souris IL-27R<sup>-/-</sup>, montrant initialement un défaut de réponse Th1 et plus tardivement une hyperactivation T et une réponse inflammatoire exacerbée, deux effets en opposition avec les effets connus de l'IL-27, suggèrent que les effets observés plus tardivement pourraient être dus non pas à un défaut de réponse à l'IL-27, mais à un défaut de réponse à une autre cytokine à la fonction immunosuppressive se liant également à la chaîne IL-27R. Cette cytokine pourrait être formée d'EBI3 et d'un partenaire encore non identifié, et être responsable des effets immunosuppresseurs sur la réponse T et sur la réponse inflammatoire. La compréhension des rôles respectifs de chaque sous-unité nécessite l'analyse en parallèle des souris déficientes pour EBI3, pour p28 et pour l'IL-27R, dans différents modèles.

### *Un rôle pour EBI3 seule?*

Alternativement à son association à une cytokine à 4 hélices  $\alpha$ , EBI3 pourrait jouer un rôle seule, à l'instar de la sous-unité p40 de l'IL-12. La sous-unité p40, sous forme d'homodimères, constitue chez la Souris un antagoniste de l'IL-12. La structure de la forme naturelle d'EBI3 n'est pas connue. Il apparaît donc intéressant de déterminer si, en conditions physiologiques, EBI3 existe sous forme d'homodimères. Dans cette optique, la structure biochimique de la forme naturelle d'EBI3 sera étudiée en collaboration avec le laboratoire d'Elliott Kieff (Harvard Medical School, Boston, Etats-Unis). Cette étude de la forme naturelle d'EBI3 est notamment justifiée par le fait que la protéine EBI3 recombinante présente des anomalies structurales.

### *EBI3, un rôle antagoniste de l'IL-27?*

Si l'hypothèse d'un rôle antagoniste se confirme, EBI3 pourrait jouer dans les lymphomes un rôle immunosuppresseur en inhibant l'activité anti-tumorale de l'IL-27. Pendant que notre analyse du profil d'expression de l'IL-27 dans les lymphomes était en cours, plusieurs études ont montré un effet anti-tumoral de l'IL-27. Dans des modèles murins de carcinome colique (Hisada, *Cancer Res* 2004 ; Chiyo, *Int J Cancer* 2005) et de neuroblastome (Salcedo, *J Immunol* 2004), la surexpression de l'IL-27 par les cellules tumorales ralentit la croissance tumorale, jusqu'à régression tumorale complète dans certains cas. L'effet anti-tumoral de l'IL-27 est dépendant des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, dont le nombre est augmenté *in situ* dans les tumeurs murines surexprimant l'IL-27 (Salcedo, *J Immunol* 2004). Dans ces modèles murins, l'IL-27 augmente la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T (Hisada, *Cancer Res* 2004 ; Salcedo, *J Immunol* 2004). Plusieurs études montrent que l'IL-27 augmente l'activité T cytotoxique (Matsui, *J Virol* 2004 ; Hisada, *Cancer Res* 2004 ; Morishima, *J Immunol* 2005). En particulier, une étude a montré que l'IL-27 agit directement sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> murins en induisant l'expression de la molécule granzyme B (Morishima, *J Immunol* 2005). L'IL-27 est également capable de potentialiser l'activité T cytotoxique de l'IL-12 contre un

antigène donné, en augmentant le nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques de l'antigène (Matsui, J Virol 2004).

Dans l'étude de Chiyo et coll., les auteurs ont infecté les cellules de carcinome colique murin avec un vecteur rétroviral contenant les gènes codant une protéine de fusion EBI3p28, mais également avec un vecteur codant EBI3 ou p28 seules. Dans ces deux derniers cas, aucun effet anti-tumoral n'est observé (Chiyo, Int J Cancer 2005). Toutefois, il n'est pas possible de tirer de conclusion de ces résultats négatifs, car les auteurs n'ont pas montré que les cellules tumorales sont capables de sécréter p28 et EBI3 à des niveaux significatifs.

➤ **Mise en évidence d'une nouvelle fonction de l'IL-27 : effets directs de l'IL-27 sur les lymphocytes B normaux humains.**

Nous montrons pour la première fois que l'IL-27 a des effets directs sur les cellules B humaines d'amygdale et que la réponse B à l'IL-27 est régulée à plusieurs niveaux. Ces effets de l'IL-27 sur les cellules B sont originaux car non décrits pour les autres cytokines de la famille de l'IL-12.

Dans ce travail, nous avons montré que l'expression du récepteur de haute affinité de l'IL-27 est régulée au cours de la différenciation lymphocytaire B et au cours de l'activation. Cette expression est constitutive sur les cellules B naïves et les B « mémoire », et est augmentée dans les 3 sous-populations B, B naïves, B du CG, et B « mémoire », après activation. Ces résultats sont en accord avec une étude du profil d'expression génique au cours de la différenciation B normale dans le CG qui montrait que le transcrite de l'IL-27R était exprimé par les cellules B naïves et que son expression était nettement diminuée au cours de la transition B naïve/B du CG, puis réaugmentée au cours de la transition B du CG/B « mémoire » pour atteindre un niveau comparable à celui observé dans les cellules B naïves (Klein, Proc Natl Acad Sci USA 2003). Par ailleurs, nous avons montré que chaque sous-population B répond différemment à l'IL-27, les cellules B naïves répondant plus fortement à l'IL-27 que les cellules B « mémoire », en particulier dans l'induction de l'expression de Tbet et de marqueurs de surface. Lors d'une stimulation via CD40, la prolifération des cellules



B naïves, mais pas celle des cellules B « mémoire », est augmentée en présence d'IL-27. Le niveau d'activation des STATs, différent dans ces deux types cellulaires, pourrait expliquer cette différence, avec un rôle prépondérant de STAT3 dans l'induction de la prolifération.

Une seule étude, publiée après l'obtention de nos premiers résultats, a montré des effets de l'IL-27 sur les cellules B murines (Yoshimoto, J Immunol 2004). Dans cette étude, seules les cellules B totales primaires spléniques murines ont été analysées et l'étude de l'expression d'une seule chaîne du récepteur de l'IL-27, la chaîne IL-27R, a été réalisée au niveau transcriptionnel seulement. Les auteurs ont montré que le transcrite de l'IL-27R est exprimé par les cellules B spléniques non stimulées et que la stimulation de ces cellules par l'IL-27 entraîne l'activation de STAT1. Ils ont également montré que l'IL-27 induit la commutation de classe vers la production d'IgG2a dans ces cellules (Yoshimoto, J Immunol 2004). Les effets de l'IL-27 sur la prolifération cellulaire, sur l'expression de molécules de surface comme le récepteur de l'IL-12, n'ont pas été analysés.

Au cours de l'analyse du profil d'expression d'EBI3 et de p28 au cours de la différenciation lymphocytaire B, nous avons observé l'expression d'EBI3, *in vitro* dans les cellules B activées via CD40 ou le BCR, et *in situ* dans des lymphocytes B tardifs du CG, certains en interaction avec des lymphocytes T. Malgré l'absence de détection de p28 dans ces cellules, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une production d'IL-27 très transitoire au cours de la différenciation B normale au stade de cellule B du CG tardive (transition cellule B du CG/cellule B post-CG), et que l'IL-27 produite par les cellules B puisse jouer en retour un rôle sur la fonction B.

Notre étude des effets de l'IL-27 sur la différenciation B normale chez l'Homme sera poursuivie par la recherche d'effets de l'IL-27 sur d'autres aspects de la différenciation B telles que la commutation de classe, la production d'immunoglobulines et de cytokines. Par ailleurs, il apparaît intéressant de préciser si l'effet de l'IL-27 sur la prolifération des cellules B résulte d'un effet sur la division cellulaire proprement dite ou sur la survie, en analysant l'effet de l'IL-27 sur l'expression de protéines régulant le cycle cellulaire ou l'apoptose. Les effets différents de l'IL-27 selon la sous-population B ou le mode d'activation de la cellule B

suggèrent que des voies de signalisation différentes, encore à définir, sont activées par l'IL-27 dans ces différentes conditions.

### ➤ **Conclusion**

Notre travail, initié par l'étude du profil d'expression d'EBI3 dans les lymphomes viro-induits, puis élargi à l'étude de l'IL-27 en pathologie humaine suite à la description de cette nouvelle cytokine hétérodimérique, suggère que le rôle d'EBI3 pourrait ne pas être limité à celui de l'hétérodimère EBI3p28. Bien que la fonction d'EBI3 en dehors de son association à p28 ne soit pas actuellement connue, il est possible qu'EBI3 puisse jouer, seule ou en association avec un autre partenaire, un rôle immunosuppresseur. Notre travail apporte également des résultats originaux sur la fonction de l'IL-27. Nous montrons que l'IL-27 a des effets directs sur les lymphocytes B humains, et que la réponse B à l'IL-27 est régulée au cours de la différenciation et de l'activation lymphocytaire B normales.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Adya, N., and Giam, C.Z. (1995). Distinct regions in human T-cell lymphotropic virus type I tax mediate interactions with activator protein CREB and basal transcription factors. *J. Virol.* *3*, 1834-1841.
2. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* *3*, 1910-1914.
3. Airoidi, I., Gri, G., Marshall, J.D., Corcione, A., Facchetti, P., Guglielmino, R., Trinchieri, G., and Pistoia, V. (2000). Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *J. Immunol.* *12*, 6880-6888.
4. Airoidi, I., Guglielmino, R., Ghiotto, F., Corcione, A., Facchetti, P., Truini, M., and Pistoia, V. (2001). Cytokine gene expression in neoplastic B cells from human mantle cell, follicular, and marginal zone lymphomas and in their postulated normal counterparts. *Cancer Res.* *4*, 1285-1290.
5. Airoidi, I., Di Carlo, E., Banelli, B., Moserle, L., Cocco, C., Pezzolo, A., Sorrentino, C., Rossi, E., Romani, M., Amadori, A., and Pistoia, V. (2004). The IL-12Rbeta2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies. *J. Clin. Invest.* *11*, 1651-1659.
6. Alizadeh, A., Eisen, M., Davis, R.E., Ma, C., Sabet, H., Tran, T., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., and Moore, D.T. *et al.* (1999). The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *71*-78.
7. Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., and Yu, X. *et al.* (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* *6769*, 503-511.
8. Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bedell, M.A., Edelhoff, S., Disteché, C.M., and Simoneaux, D.K. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* *5097*, 990-993.
9. Artis, D., Villarino, A., Silverman, M., He, W., Thornton, E.M., Mu, S., Summer, S., Covey, T.M., Huang, E., and Yoshida, H. *et al.* (2004). The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J. Immunol.* *9*, 5626-5634.
10. Artis, D., Johnson, L.M., Joyce, K., Saris, C., Villarino, A., Hunter, C.A., and Scott, P. (2004). Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* *8*, 4672-4675.
11. Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, L.S., Stenkamp, R., and Neubauer, M. (1993). The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* *2*, 291-300.

12. Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D.A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 3, 395-404.
13. Bacon, C.M., McVicar, D.W., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., O'Shea, J.J., and Johnston, J.A. (1995). Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J. Exp. Med.* 1, 399-404.
14. Bacon, C.M., Petricoin, E.F., 3rd, Ortaldo, J.R., Rees, R.C., Larner, A.C., Johnston, J.A., and O'Shea, J.J. (1995). Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 16, 7307-7311.
15. Bahler, D.W., Campbell, M.J., Hart, S., Miller, R.A., Levy, S., and Levy, R. (1991). Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* 6, 1561-1568.
16. Bahler, D.W., and Levy, R. (1992). Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 15, 6770-6774.
17. Baichwal, V.R., and Sugden, B. (1988). Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 5, 461-467.
18. Ballard, D.W., Bohnlein, E., Lowenthal, J.W., Wano, Y., Franza, B.R., and Greene, W.C. (1988). HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science* 4873, 1652-1655.
19. Bancroft, A.J., Humphreys, N.E., Worthington, J.J., Yoshida, H., and Grencis, R.K. (2004). WSX-1: a key role in induction of chronic intestinal nematode infection. *J. Immunol.* 12, 7635-7641.
20. Bargou, R.C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M.Y., Bommert, K., Royer, H.D., Scheidereit, C., and Dorken, B. (1996). High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 10, 4340-4347.
21. Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., and Dorken, B. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.* 12, 2961-2969.
22. Barth, T.F., Martin-Subero, J.I., Joos, S., Menz, C.K., Hasel, C., Mechttersheimer, G., Parwaresch, R.M., Lichter, P., Siebert, R., and Mooller, P. (2003). Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 9, 3681-3686.
23. Bazan, J.F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 18, 6934-6938.
24. Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P.R., Autenrieth, I., and Neurath, M.F. (2003). Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 5, 693-706.

25. Bellan, C., Lazzi, S., Hummel, M., Palumbo, N., de Santi, M., Amato, T., Nyagol, J., Sabattini, E., Lazure, T., and Pileri, S.A. *et al.* (2005). Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood* 3, 1031-1036.
26. Bergsagel, P.L., Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Kirby, S.L., and Kuehl, W.M. (1996). Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 24, 13931-13936.
27. Boulland, M.L., Meignin, V., Leroy-Viard, K., Copie-Bergman, C., Briere, J., Touitou, R., Kanavaros, P., and Gaulard, P. (1998). Human interleukin-10 expression in T/natural killer-cell lymphomas: association with anaplastic large cell lymphomas and nasal natural killer-cell lymphomas. *Am. J. Pathol.* 4, 1229-1237.
28. Braeuninger, A., Kuppers, R., Strickler, J.G., Wacker, H.H., Rajewsky, K., and Hansmann, M.L. (1997). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 17, 9337-9342.
29. Brink, A.A., Dukers, D.F., van den Brule, A.J., Oudejans, J.J., Middeldorp, J.M., Meijer, C.J., and Jiwa, M. (1997). Presence of Epstein-Barr virus latency type III at the single cell level in post-transplantation lymphoproliferative disorders and AIDS related lymphomas. *J. Clin. Pathol.* 11, 911-918.
30. Brunda, M.J., Luistro, L., Warriar, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F., and Gately, M.K. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J. Exp. Med.* 4, 1223-1230.
31. Burger, R., Bakker, F., Guenther, A., Baum, W., Schmidt-Arras, D., Hideshima, T., Tai, Y.T., Shringarpure, R., Catley, L., Senaldi, G., Gramatzki, M., and Anderson, K.C. (2003). Functional significance of novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) for human myeloma cell growth and survival. *Br. J. Haematol.* 5, 869-878.
32. Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F., and Hay, R.T. (1999). Mutations in the I $\kappa$ B $\alpha$  gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I $\kappa$ B $\alpha$ . *Oncogene* 20, 3063-3070.
33. Cahir-McFarland, E.D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltmane, J.M., Henrickson, S.E., Staudt, L.M., and Kieff, E. (2004). Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J. Virol.* 8, 4108-4119.
34. Cahir-McFarland, E.D., Davidson, D.M., Schauer, S.L., Duong, J., and Kieff, E. (2000). NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 11, 6055-6060.
35. Carbone, A., Gloghini, A., Gattei, V., Aldinucci, D., Degan, M., De Paoli, P., Zagonel, V., and Pinto, A. (1995). Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood* 3, 780-789.

36. Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 2, 747-752.
37. Chapman, C.J., Mockridge, C.I., Rowe, M., Rickinson, A.B., and Stevenson, F.K. (1995). Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity. *Blood* 8, 2176-2181.
38. Chapman, C.J., Zhou, J.X., Gregory, C., Rickinson, A.B., and Stevenson, F.K. (1996). VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation, intraclonal heterogeneity, and a role for antigen selection. *Blood* 9, 3562-3568.
39. Chen, Q., Ghilardi, N., Wang, H., Baker, T., Xie, M.H., Gurney, A., Grewal, I.S., and de Sauvage, F.J. (2000). Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 6806, 916-920.
40. Chiang, A.K., Tao, Q., Srivastava, G., and Ho, F.C. (1996). Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* 3, 285-290.
41. Chiyo, M., Shimozato, O., Iizasa, T., Fujisawa, T., and Tagawa, M. (2004). Antitumor effects produced by transduction of dendritic cells-derived heterodimeric cytokine genes in murine colon carcinoma cells. *Anticancer Res.* 6, 3763-3767.
42. Chiyo, M., Shimozato, O., Yu, L., Kawamura, K., Iizasa, T., Fujisawa, T., and Tagawa, M. (2005). Expression of IL-27 in murine carcinoma cells produces antitumor effects and induces protective immunity in inoculated host animals. *Int. J. Cancer* 3, 437-442.
43. 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., and Gately, M.K. (1994). Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J. Immunol.* 1, 128-136.
44. Colombo, M.P., and Trinchieri, G. (2002). Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2, 155-168.
45. Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., and Churakova, T. *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 6924, 744-748.
46. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., and Kolitz, J. *et al.* (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 6, 1840-1847.
47. D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., and Nickbarg, E. (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 5, 1387-1398.

48. Dave, S.S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Rimsza, L.M., and Grogan, T.M. *et al.* (2004). Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N. Engl. J. Med.* *21*, 2159-2169.
49. Deacon, E.M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A.B., and Young, L.S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J. Exp. Med.* *2*, 339-349.
50. Desai, B.B., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Mongini, P.K., Chizzonite, R., and Gately, M.K. (1992). IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J. Immunol.* *10*, 3125-3132.
51. Devergne, O., Hummel, M., Koeppen, H., Le Beau, M.M., Nathanson, E.C., Kieff, E., and Birkenbach, M. (1996). A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J. Virol.* *2*, 1143-1153.
52. Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 7098-7108.
53. Devergne, O., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *22*, 12041-12046.
54. Devergne, O., Cahir McFarland, E.D., Mosialos, G., Izumi, K.M., Ware, C.F., and Kieff, E. (1998). Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J. Virol.* *10*, 7900-7908.
55. Devergne, O., Coulomb-L'Hermine, A., Capel, F., Moussa, M., and Capron, F. (2001). Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am. J. Pathol.* *5*, 1763-1776.
56. DiSanto, J.P., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (1993). CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* *6412*, 541-543.
57. Durali, D., de Goer de Herve, M.G., Giron-Michel, J., Azzarone, B., Delfraissy, J.F., and Taoufik, Y. (2003). In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. *Blood* *12*, 4084-4089.
58. Elson, G.C., Graber, P., Losberger, C., Herren, S., Gretener, D., Menoud, L.N., Wells, T.N., Kosco-Vilbois, M.H., and Gauchat, J.F. (1998). Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J. Immunol.* *3*, 1371-1379.
59. Elson, G.C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A.B., Delneste, Y., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F., and Gascan, H. (2000). CLF associates



with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat. Neurosci.* **9**, 867-872.

60. Fagarasan, S., and Honjo, T. (2004). Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 277-283.

61. Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S.L., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K., and Rassenti, L.Z. *et al.* (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* **8**, 1515-1525.

62. Ferrer, A., Ollila, J., Tobin, G., Nagy, B., Thunberg, U., Aalto, Y., Vihinen, M., Vilpo, J., Rosenquist, R., and Knuutila, S. (2004). Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **1**, 69-72.

63. Feuillard, J., Taylor, D., Casamayor-Palleja, M., Johnson, G.D., and MacLennan, I.C. (1995). Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching. *Int. Immunol.* **1**, 121-130.

64. Fisher, S.G., and Fisher, R.I. (2004). The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* **38**, 6524-6534.

65. Gachon, F., Peleraux, A., Thebault, S., Dick, J., Lemasson, I., Devaux, C., and Mesnard, J.M. (1998). CREB-2, a cellular CRE-dependent transcription repressor, functions in association with Tax as an activator of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter. *J. Virol.* **10**, 8332-8337.

66. Garcia, J.F., Camacho, F.I., Morente, M., Fraga, M., Montalban, C., Alvaro, T., Bellas, C., Castano, A., Diez, A., and Flores, T. *et al.* (2003). Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* **2**, 681-689.

67. Gerth, A.J., Lin, L., and Peng, S.L. (2003). T-bet regulates T-independent IgG2a class switching. *Int. Immunol.* **8**, 937-944.

68. Ghilardi, N., Kljavin, N., Chen, Q., Lucas, S., Gurney, A.L., and De Sauvage, F.J. (2004). Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23-deficient mice. *J. Immunol.* **5**, 2827-2833.

69. Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J.* **11**, 3064-3073.

70. Goldberg, R., Zohar, Y., Wildbaum, G., Geron, Y., Maor, G., and Karin, N. (2004). Suppression of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J. Immunol.* **10**, 6465-6471.

71. Goldberg, R., Wildbaum, G., Zohar, Y., Maor, G., and Karin, N. (2004). Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J. Immunol.* *2*, 1171-1178.
72. Goossens, T., Klein, U., and Kuppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *5*, 2463-2468.
73. Grassmann, R., Dengler, C., Muller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., McGuire, K., Dokhelar, M.C., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1989). Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *9*, 3351-3355.
74. Grassmann, R., Berchtold, S., Radant, I., Alt, M., Fleckenstein, B., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., and Ramstedt, U. (1992). Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J. Virol.* *7*, 4570-4575.
75. Greiner, A., Tobollik, S., Buettner, M., Jungnickel, B., Herrmann, K., Kremmer, E., and Niedobitek, G. (2005). Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J. Pathol.* *5*, 541-547.
76. Grohmann, U., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (1998). IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity* *3*, 315-323.
77. Grossman, W.J., Kimata, J.T., Wong, F.H., Zutter, M., Ley, T.J., and Ratner, L. (1995). Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *4*, 1057-1061.
78. Gubler, U., Chua, A.O., Schoenhaut, D.S., Dwyer, C.M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., and Familletti, P.C. (1991). Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *10*, 4143-4147.
79. Guery, J.C., Ria, F., Galbiati, F., and Adorini, L. (1997). Normal B cells fail to secrete interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* *7*, 1632-1639.
80. Hamano, S., Himeno, K., Miyazaki, Y., Ishii, K., Yamanaka, A., Takeda, A., Zhang, M., Hisaeda, H., Mak, T.W., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2003). WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* *5*, 657-667.
81. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *6*, 1848-1854.

82. Hanna, M.G., Jr. (1964). An autoradiographic study of the germinal center in spleen white pulp during early intervals of the immune response. *Lab. Invest.* 95-104.
83. Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Campo, E., Braziel, R.M., and Jaffe, E.S. *et al.* (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 1, 275-282.
84. Haque, A.K., Myers, J.L., Hudnall, S.D., Gelman, B.B., Lloyd, R.V., Payne, D., and Borucki, M. (1998). Pulmonary lymphomatoid granulomatosis in acquired immunodeficiency syndrome: lesions with Epstein-Barr virus infection. *Mod. Pathol.* 4, 347-356.
85. Harabuchi, Y., Imai, S., Wakashima, J., Hirao, M., Kataura, A., Osato, T., and Kon, S. (1996). Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein-Barr virus: clinicopathologic, phenotypic, and genotypic studies. *Cancer* 10, 2137-2149.
86. Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R., and Kastelein, R.A. (2003). IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 9, 513-522.
87. 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* 6, 1149-1157.
88. Higuchi, M., Kieff, E., and Izumi, K.M. (2002). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 1, 455-459.
89. Hinz, M., Loser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dorken, B., and Scheidereit, C. (2001). Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 9, 2798-2807.
90. Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dorken, B., Zenke, M., Stein, H., and Scheidereit, C. (2002). Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J. Exp. Med.* 5, 605-617.
91. Hisada, M., Kamiya, S., Fujita, K., Belladonna, M.L., Aoki, T., Koyanagi, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2004). Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res.* 3, 1152-1156.
92. Holscher, C., Holscher, A., Ruckerl, D., Yoshimoto, T., Yoshida, H., Mak, T., Saris, C., and Ehlers, S. (2005). The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J. Immunol.* 6, 3534-3544.
93. Horie, R., Watanabe, T., Morishita, Y., Ito, K., Ishida, T., Kanegae, Y., Saito, I., Higashihara, M., Mori, S., Kadin, M.E., and Watanabe, T. (2002). Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 16, 2493-2503.

94. Horie, R., Watanabe, T., Ito, K., Morisita, Y., Watanabe, M., Ishida, T., Higashihara, M., Kadin, M., and Watanabe, T. (2002). Cytoplasmic aggregation of TRAF2 and TRAF5 proteins in the Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Am. J. Pathol.* 5, 1647-1654.
95. Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 5107, 547-549.
96. Hsu, S.M., Xie, S.S., Hsu, P.L., and Waldron, J.A., Jr. (1992). Interleukin-6, but not interleukin-4, is expressed by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease with or without histologic features of Castleman's disease. *Am. J. Pathol.* 1, 129-138.
97. Izumi, K.M., and Kieff, E.D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 23, 12592-12597.
98. Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Riley, E.A., Rizzo, D., Chen, Y., and Kieff, E. (1999). The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 12, 9908-9916.
99. Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Ting, A.T., Riley, E.A., Seed, B., and Kieff, E.D. (1999). The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 8, 5759-5767.
100. Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Jr, and Murphy, K.M. (1995). Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J. Exp. Med.* 5, 1755-1762.
101. Jelinek, D.F., and Braaten, J.K. (1995). Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. *J. Immunol.* 4, 1606-1613.
102. Joos, S., Menz, C.K., Wrobel, G., Siebert, R., Gesk, S., Ohl, S., Mechttersheimer, G., Trumper, L., Moller, P., Lichter, P., and Barth, T.F. (2002). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* 4, 1381-1387.
103. Jucker, M., Abts, H., Li, W., Schindler, R., Merz, H., Gunther, A., von Kalle, C., Schaadt, M., Diamantstein, T., and Feller, A.C. (1991). Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. *Blood* 11, 2413-2418.
104. Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Brauninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2000). Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J. Exp. Med.* 2, 395-402.

105. Kalinski, P., Smits, H.H., Schuitemaker, J.H., Vieira, P.L., van Eijk, M., de Jong, E.C., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (2000). IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J. Immunol.* *4*, 1877-1881.
106. Kamiya, S., Owaki, T., Morishima, N., Fukai, F., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2004). An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* *6*, 3871-3877.
107. Kanavaros, P., Lesco, M.C., Briere, J., Divine, M., Galateau, F., Joab, I., Bosq, J., Farcet, J.P., Reyes, F., and Gaulard, P. (1993). Nasal T-cell lymphoma: a clinicopathologic entity associated with peculiar phenotype and with Epstein-Barr virus. *Blood* *10*, 2688-2695.
108. Kanzler, H., Kuppers, R., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J. Exp. Med.* *4*, 1495-1505.
109. Kapp, U., Yeh, W.C., Patterson, B., Elia, A.J., Kagi, D., Ho, A., Hessel, A., Tipsword, M., Williams, A., and Mirtsos, C. *et al.* (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J. Exp. Med.* *12*, 1939-1946.
110. Kaye, K.M., Izumi, K.M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *19*, 9150-9154.
111. Kelly, G., Bell, A., and Rickinson, A. (2002). Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat. Med.* *10*, 1098-1104.
112. Kelsoe, G. (1996). The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Semin. Immunol.* *3*, 179-184.
113. Kepler, T.B., and Perelson, A.S. (1993). Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol. Today* *8*, 412-415.
114. Kim, H.S., Choi, E.H., Khan, J., Roilides, E., Francesconi, A., Kasai, M., Sein, T., Schaufele, R.L., Sakurai, K., and Son, C.G. *et al.* (2005). Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* *6*, 3714-3724.
115. Kinoshita, T., Shimoyama, M., Tobinai, K., Ito, M., Ito, S., Ikeda, S., Tajima, K., Shimotohno, K., and Sugimura, T. (1989). Detection of mRNA for the *tax1/rex1* gene of human T-cell leukemia virus type I in fresh peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukemia patients and viral carriers by using the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *14*, 5620-5624.
116. Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., and Baldini, L. *et al.* (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* *11*, 1625-1638.

117. Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr, Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 5, 2639-2644.
118. Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 3, 827-845.
119. Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 175-187.
120. Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V., and Raab-Traub, N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 20, 11963-11968.
121. Kuppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 251-262.
122. Kuppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M.L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 23, 10962-10966.
123. la Sala, A., Gadina, M., and Kelsall, B.L. (2005). G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK. *J. Immunol.* 5, 2994-2999.
124. Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 2, 233-240.
125. Lee, E., Trepicchio, W.L., Oestreicher, J.L., Pittman, D., Wang, F., Chamian, F., Dhodapkar, M., and Krueger, J.G. (2004). Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J. Exp. Med.* 1, 125-130.
126. Lieberman, L.A., Cardillo, F., Owyang, A.M., Rennick, D.M., Cua, D.J., Kastelein, R.A., and Hunter, C.A. (2004). IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *J. Immunol.* 3, 1887-1893.
127. Lossos, I.S., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Chan, W.C., Brown, P.O., Botstein, D., Staudt, L.M., and Levy, R. (2000). Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 18, 10209-10213.
128. Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., and de Sauvage, F.J. (2003). IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4<sup>+</sup> T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 25, 15047-15052.

129. Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* *10*, 5071-5079.
130. MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 117-139.
131. Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* *4*, 1199-1204.
132. Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H.D., Falini, B., Delsol, G., Isaacson, P.G., Pileri, S., and Stein, H. (1997). Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N. Engl. J. Med.* *7*, 453-458.
133. Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., and Stein, H. (2000). Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* *4*, 1443-1450.
134. Marriott, S.J., Lemoine, F.J., and Jeang, K.T. (2002). Damaged DNA and miscounted chromosomes: human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein and genetic lesions in transformed cells. *J. Biomed. Sci.* *4*, 292-298.
135. Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., Dyer, M.J., and Siebert, R. (2002). Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *4*, 1474-1477.
136. Matsui, M., Moriya, O., Belladonna, M.L., Kamiya, S., Lemonnier, F.A., Yoshimoto, T., and Akatsuka, T. (2004). Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice. *J. Virol.* *17*, 9093-9104.
137. McHeyzer-Williams, L.J., Driver, D.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2001). Germinal center reaction. *Curr. Opin. Hematol.* *1*, 52-59.
138. Merz, H., Houssiau, F.A., Orscheschek, K., Renauld, J.C., Fliedner, A., Herin, M., Noel, H., Kadin, M., Mueller-Hermelink, H.K., and Van Snick, J. (1991). Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood* *5*, 1311-1317.
139. Meyer-Hermann, M.E., and Maini, P.K. (2005). Cutting edge: back to "one-way" germinal centers. *J. Immunol.* *5*, 2489-2493.

140. Miyazaki, Y., Inoue, H., Matsumura, M., Matsumoto, K., Nakano, T., Tsuda, M., Hamano, S., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2005). Exacerbation of experimental allergic asthma by augmented Th2 responses in WSX-1-deficient mice. *J. Immunol.* *4*, 2401-2407.
141. Mori, N., Fujii, M., Ikeda, S., Yamada, Y., Tomonaga, M., Ballard, D.W., and Yamamoto, N. (1999). Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* *7*, 2360-2368.
142. Morishima, N., Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2005). Augmentation of effector CD8+ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J. Immunol.* *3*, 1686-1693.
143. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* *3*, 389-399.
144. Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.P., Yang, S.Y., and Reiner, S.L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* *5523*, 1907-1910.
145. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *5*, 553-563.
146. Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., and Cua, D.J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *12*, 1951-1957.
147. Myers, J.L., Kurtin, P.J., Katzenstein, A.L., Tazelaar, H.D., Colby, T.V., Strickler, J.G., Lloyd, R.V., and Isaacson, P.G. (1995). Lymphomatoid granulomatosis. Evidence of immunophenotypic diversity and relationship to Epstein-Barr virus infection. *Am. J. Surg. Pathol.* *11*, 1300-1312.
148. Nagai, M., Brennan, M.B., Sakai, J.A., Mora, C.A., and Jacobson, S. (2001). CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood* *6*, 1858-1861.
149. Nagai, T., Devergne, O., Mueller, T.F., Perkins, D.L., van Seventer, J.M., and van Seventer, G.A. (2003). Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation. *J. Immunol.* *10*, 5233-5243.
150. Nanni, P., Nicoletti, G., De Giovanni, C., Landuzzi, L., Di Carlo, E., Cavallo, F., Pupa, S.M., Rossi, I., Colombo, M.P., and Ricci, C. *et al.* (2001). Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J. Exp. Med.* *9*, 1195-1205.



151. Nerenberg, M., Hinrichs, S.H., Reynolds, R.K., Khoury, G., and Jay, G. (1987). The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* 4820, 1324-1329.
152. Neri, A., Barriga, F., Knowles, D.M., Magrath, I.T., and Dalla-Favera, R. (1988). Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 8, 2748-2752.
153. Newcom, S.R., Kadin, M.E., Ansari, A.A., and Diehl, V. (1988). L-428 nodular sclerosing Hodgkin's cell secretes a unique transforming growth factor-beta active at physiologic pH. *J. Clin. Invest.* 6, 1915-1921.
154. Niedobitek, G., Herbst, H., Young, L.S., Brooks, L., Masucci, M.G., Crocker, J., Rickinson, A.B., and Stein, H. (1992). Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood* 10, 2520-2526.
155. Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D.H., and Young, L.S. (1997). Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotypy of EBV-infected cells. *J. Pathol.* 2, 151-159.
156. Niedobitek, G., Pazolt, D., Teichmann, M., and Devergne, O. (2002). Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EB13, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J. Pathol.* 3, 310-316.
157. Nieuwenhuis, E.E., Neurath, M.F., Corazza, N., Iijima, H., Trgovcich, J., Wirtz, S., Glickman, J., Bailey, D., Yoshida, M., and Galle, P.R. *et al.* (2002). Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 26, 16951-16956.
158. Niitsu, Y., Urushizaki, Y., Koshida, Y., Terui, K., Mahara, K., Kohgo, Y., and Urushizaki, I. (1988). Expression of TGF-beta gene in adult T cell leukemia. *Blood* 1, 263-266.
159. Noguchi, Y., Jungbluth, A., Richards, E.C., and Old, L.J. (1996). Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 21, 11798-11801.
160. Ohno, T., Stribley, J.A., Wu, G., Hinrichs, S.H., Weisenburger, D.D., and Chan, W.C. (1997). Clonality in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 7, 459-465.
161. Ohshima, K., Akaiwa, M., Umeshita, R., Suzumiya, J., Izuhara, K., and Kikuchi, M. (2001). Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. *Histopathology* 4, 368-375.
162. Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., and Singh, K. *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 5, 715-725.

163. Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., and Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 8488, 1031-1032.
164. O'Shea, J.J., Gadina, M., and Schreiber, R.D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* S121-31.
165. Oshima, Y., and Puri, R.K. (2001). Suppression of an IL-13 autocrine growth loop in a human Hodgkin/Reed-Sternberg tumor cell line by a novel IL-13 antagonist. *Cell. Immunol.* 1, 37-42.
166. Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., and Murphy, K.M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 1, 27-37.
167. Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K.P., and Vega, F. *et al.* (2002). A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* 11, 5699-5708.
168. Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Kuppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 6844, 341-346.
169. Pearl, J.E., Khader, S.A., Solache, A., Gilmartin, L., Ghilardi, N., deSavauge, F., and Cooper, A.M. (2004). IL-27 signaling compromises control of bacterial growth in mycobacteria-infected mice. *J. Immunol.* 12, 7490-7496.
170. Pelicci, P.G., Knowles, D.M., 2nd, Magrath, I., and Dalla-Favera, R. (1986). Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 9, 2984-2988.
171. Peng, S.L., Szabo, S.J., and Glimcher, L.H. (2002). T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 8, 5545-5550.
172. Pflanz, S., Timans, J.C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., and Vaisberg, E. *et al.* (2002). IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 6, 779-790.
173. Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J.F., Phillips, J.H., McClanahan, T.K., de Waal Malefyt, R., and Kastelein, R.A. (2004). WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J. Immunol.* 4, 2225-2231.
174. Plun-Favreau, H., Elson, G., Chabbert, M., Froger, J., deLapeyriere, O., Lelievre, E., Guillet, C., Hermann, J., Gauchat, J.F., Gascan, H., and Chevalier, S. (2001). The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *EMBO J.* 7, 1692-1703.

175. Presky, D.H., Yang, H., Minetti, L.J., Chua, A.O., Nabavi, N., Wu, C.Y., Gately, M.K., and Gubler, U. (1996). A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 24, 14002-14007.
176. Reddy, T.R., Tang, H., Li, X., and Wong-Staal, F. (1997). Functional interaction of the HTLV-1 transactivator Tax with activating transcription factor-4 (ATF4). *Oncogene* 23, 2785-2792.
177. Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., and Gennery, A. *et al.* (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 5, 565-575.
178. Richardson, J.H., Edwards, A.J., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Dalgleish, A.G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* 11, 5682-5687.
179. Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., and Giltmane, J.M. *et al.* (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 25, 1937-1947.
180. Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Zhao, T., Haioun, C., and Greiner, T.C. *et al.* (2003). Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* 6, 851-862.
181. Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Gascoyne, R.D., Grogan, T.M., Muller-Hermelink, H.K., and Smeland, E.B. *et al.* (2003). The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer. Cell.* 2, 185-197.
182. Rowe, M., Rowe, D.T., Gregory, C.D., Young, L.S., Farrell, P.J., Rupani, H., and Rickinson, A.B. (1987). Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.* 9, 2743-2751.
183. Rozwarski, D.A., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., Bazan, J.F., Bohm, A., Wlodawer, A., Hatada, M., and Karplus, P.A. (1994). Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure* 3, 159-173.
184. Ruckes, T., Saul, D., Van Snick, J., Hermine, O., and Grassmann, R. (2001). Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309. *Blood* 4, 1150-1159.
185. 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. *J. Immunol.* 12, 4066-4071.

186. Salcedo, R., Stauffer, J.K., Lincoln, E., Back, T.C., Hixon, J.A., Hahn, C., Shafer-Weaver, K., Malyguine, A., Kastelein, R., and Wigginton, J.M. (2004). IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* *172*, 7170-7182.
187. Sawyer, J.R., Waldron, J.A., Jagannath, S., and Barlogie, B. (1995). Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet. Cytogenet.* *87*, 41-49.
188. Schultze, J.L., Michalak, S., Lowne, J., Wong, A., Gilleece, M.H., Gribben, J.G., and Nadler, L.M. (1999). Human non-germinal center B cell interleukin (IL)-12 production is primarily regulated by T cell signals CD40 ligand, interferon gamma, and IL-10: role of B cells in the maintenance of T cell responses. *J. Exp. Med.* *190*, 1-12.
189. Senaldi, G., Varnum, B.C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., and Shaklee, C.L. *et al.* (1999). Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 11458-11463.
190. Senaldi, G., Stolina, M., Guo, J., Faggioni, R., McCabe, S., Kaufman, S.A., Van, G., Xu, W., Fletcher, F.A., and Boone, T. *et al.* (2002). Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J. Immunol.* *169*, 5690-5698.
191. Sendtner, M., Carroll, P., Holtmann, B., Hughes, R.A., and Thoenen, H. (1994). Ciliary neurotrophic factor. *J. Neurobiol.* *25*, 1436-1453.
192. Setsuda, J., Teruya-Feldstein, J., Harris, N.L., Ferry, J.A., Sorbara, L., Gupta, G., Jaffe, E.S., and Tosato, G. (1999). Interleukin-18, interferon-gamma, IP-10, and Mig expression in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis and posttransplant lymphoproliferative disease. *Am. J. Pathol.* *155*, 257-265.
193. Shi, Y., Wang, W., Yourey, P.A., Gohari, S., Zukauskas, D., Zhang, J., Ruben, S., and Alderson, R.F. (1999). Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *257*, 132-138.
194. Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br. J. Haematol.* *67*, 428-437.
195. Skinnider, B.F., and Mak, T.W. (2002). The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *100*, 4283-4297.
196. Sprecher, C.A., Grant, F.J., Baumgartner, J.W., Presnell, S.R., Schrader, S.K., Yamagiwa, T., Whitmore, T.E., O'Hara, P.J., and Foster, D.F. (1998). Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *245*, 82-90.
197. Suzuki, T., Fujisawa, J.I., Toita, M., and Yoshida, M. (1993). The trans-activator tax of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) interacts with cAMP-responsive element (CRE) binding and

- CRE modulator proteins that bind to the 21-base-pair enhancer of HTLV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2, 610-614.
198. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 6, 655-669.
199. Takeda, A., Hamano, S., Yamanaka, A., Hanada, T., Ishibashi, T., Mak, T.W., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2003). Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J. Immunol.* 10, 4886-4890.
200. Tamaru, J., Hummel, M., Marafioti, T., Kalvelage, B., Leoncini, L., Minacci, C., Tosi, P., Wright, D., and Stein, H. (1995). Burkitt's lymphomas express VH genes with a moderate number of antigen-selected somatic mutations. *Am. J. Pathol.* 5, 1398-1407.
201. Tamiya, S., Matsuoka, M., Etoh, K., Watanabe, T., Kamihira, S., Yamaguchi, K., and Takatsuki, K. (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 8, 3065-3073.
202. Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M., and Hatanaka, M. (1990). Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 3, 1071-1075.
203. Teruya-Feldstein, J., Jaffe, E.S., Burd, P.R., Kanegane, H., Kingma, D.W., Wilson, W.H., Longo, D.L., and Tosato, G. (1997). The role of Mig, the monokine induced by interferon-gamma, and IP-10, the interferon-gamma-inducible protein-10, in tissue necrosis and vascular damage associated with Epstein-Barr virus-positive lymphoproliferative disease. *Blood* 10, 4099-4105.
204. Teruya-Feldstein, J., Jaffe, E.S., Burd, P.R., Kingma, D.W., Setsuda, J.E., and Tosato, G. (1999). Differential chemokine expression in tissues involved by Hodgkin's disease: direct correlation of eotaxin expression and tissue eosinophilia. *Blood* 8, 2463-2470.
205. Thieblemont, C., Nasser, V., Felman, P., Leroy, K., Gazzo, S., Callet-Bauchu, E., Loricod, B., Granjeaud, S., Gaulard, P., and Haioun, C. *et al.* (2004). Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. *Blood* 7, 2727-2737.
206. Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 133-146.
207. Villarino, A., Hibbert, L., Lieberman, L., Wilson, E., Mak, T., Yoshida, H., Kastelein, R.A., Saris, C., and Hunter, C.A. (2003). The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 5, 645-655.
208. Villiger, P.M., Cronin, M.T., Amenomori, T., Wachsmann, W., and Lotz, M. (1991). IL-6 production by human T lymphocytes. Expression in HTLV-1-infected but not in normal T cells. *J. Immunol.* 2, 550-559.

209. Waldele, K., Schneider, G., Ruckes, T., and Grassmann, R. (2004). Interleukin-13 overexpression by tax transactivation: a potential autocrine stimulus in human T-cell leukemia virus-infected lymphocytes. *J. Virol.* *12*, 6081-6090.
210. Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* *3 Pt 2*, 831-840.
211. Wano, Y., Hattori, T., Matsuoka, M., Takatsuki, K., Chua, A.O., Gubler, U., and Greene, W.C. (1987). Interleukin 1 gene expression in adult T cell leukemia. *J. Clin. Invest.* *3*, 911-916.
212. Wano, Y., Feinberg, M., Hosking, J.B., Bogerd, H., and Greene, W.C. (1988). Stable expression of the tax gene of type I human T-cell leukemia virus in human T cells activates specific cellular genes involved in growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *24*, 9733-9737.
213. Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Le Deist, F.F., de Saint Basile, G.G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2001). CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *3*, 1166-1170.
214. Welzel, N., Le, T., Marculescu, R., Mitterbauer, G., Chott, A., Pott, C., Kneba, M., Du, M.Q., Kusec, R., and Drach, J. *et al.* (2001). Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* *4*, 1629-1636.
215. Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., and Hewick, R.M. (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* *9*, 3074-3081.
216. Wood, K.M., Roff, M., and Hay, R.T. (1998). Defective IkappaBalpha in Hodgkin cell lines with constitutively active NF-kappaB. *Oncogene* *16*, 2131-2139.
217. Xu, X., Heidenreich, O., Kitajima, I., McGuire, K., Li, Q., Su, B., and Nerenberg, M. (1996). Constitutively activated JNK is associated with HTLV-1 mediated tumorigenesis. *Oncogene* *1*, 135-142.
218. Yamanaka, A., Hamano, S., Miyazaki, Y., Ishii, K., Takeda, A., Mak, T.W., Himeno, K., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2004). Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis. *J. Immunol.* *6*, 3590-3596.
219. Yin, M.J., Paulssen, E.J., Seeler, J.S., and Gaynor, R.B. (1995). Protein domains involved in both in vivo and in vitro interactions between human T-cell leukemia virus type I tax and CREB. *J. Virol.* *6*, 3420-3432.
220. Yoshida, M., Suzuki, T., Fujisawa, J., and Hirai, H. (1995). HTLV-1 oncoprotein tax and cellular transcription factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *79*-89.

221. Yoshida, H., Hamano, S., Senaldi, G., Covey, T., Faggioni, R., Mu, S., Xia, M., Wakeham, A.C., Nishina, H., Potter, J., Saris, C.J., and Mak, T.W. (2001). WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity* 4, 569-578.
222. Yoshimoto, T., Okada, K., Morishima, N., Kamiya, S., Owaki, T., Asakawa, M., Iwakura, Y., Fukai, F., and Mizuguchi, J. (2004). Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. *J. Immunol.* 4, 2479-2485.
223. Young, L., Alfieri, C., Hennessy, K., Evans, H., O'Hara, C., Anderson, K.C., Ritz, J., Shapiro, R.S., Rickinson, A., and Kieff, E. (1989). Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N. Engl. J. Med.* 16, 1080-1085.
224. Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer.* 10, 757-768.
225. Yssel, H., de Waal Malefyt, R., Duc Dodon, M.D., Blanchard, D., Gazzolo, L., de Vries, J.E., and Spits, H. (1989). Human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection of a CD4+ proliferative/cytotoxic T cell clone progresses in at least two distinct phases based on changes in function and phenotype of the infected cells. *J. Immunol.* 7, 2279-2289.
226. Zhan, F., Tian, E., Bumm, K., Smith, R., Barlogie, B., and Shaughnessy, J., Jr. (2003). Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood* 3, 1128-1140.
227. Zahn, S., Wirtz, S., Birkenbach, M., Blumberg, R.S., Neurath, M.F., and von Stebut, E. (2005). Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* 4, 1106-1112.
228. Zhao, L.J., and Giam, C.Z. (1992). Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 15, 7070-7074.
229. Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 4, 587-596.

## **RESUME**

L'interleukine (IL)-27, constituée de EBV-induced gene 3 (EBI3) et de p28, joue un rôle important dans la régulation des réponses T. Son rôle dans la réponse B est peu connu. EBI3 est une protéine induite *in vitro* par l'oncogène viral LMP1 via l'activation de NF- $\kappa$ B. Ce travail montre qu'EBI3 est également induite par l'oncogène Tax du virus HTLV-1, de façon dépendante de NF- $\kappa$ B, et est exprimée *in situ* par les cellules tumorales dans les lymphomes EBV<sup>+</sup> LMP1<sup>+</sup> et dans certains lymphomes associés à l'HTLV-1, en l'absence de détection de p28. Nous montrons que l'IL-27 a des effets directs sur le lymphocyte B humain, modulés au cours de la différenciation et dépendants du type de co-stimulation. EBI3, mais pas p28, est exprimée par des cellules B du centre germinatif (CG) et par les cellules tumorales de lymphomes B d'origine du CG. Ces résultats suggèrent un rôle d'EBI3 indépendamment de son association à p28.

## **MOTS-CLES**

EBI3, Interleukine-27, EBV, HTLV-1, Lymphome, Différenciation lymphocytaire B