



HAL
open science

Analyse des variantes d'épissage de l'Interleukine-4 dans l'étude de la réponse immunitaire

Caroline Hauvespre

► **To cite this version:**

Caroline Hauvespre. Analyse des variantes d'épissage de l'Interleukine-4 dans l'étude de la réponse immunitaire. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10312 . tel-00994430

HAL Id: tel-00994430

<https://theses.hal.science/tel-00994430>

Submitted on 21 May 2014

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)
Mention Immunologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 14 décembre 2012

Par
Caroline HAUVESPRE

**ANALYSE DES VARIANTS D'ÉPISSAGE DE L'INTERLEUKINE-4
DANS L'ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE**

Directeur de thèse :	Dr. Régis SODOYER
Encadrantes de Recherche:	Dr. Virginie COURTOIS
	Dr. Karelle DE LUCA
Co-directrice de Thèse :	Dr. Catherine LACHUER

Jury :

Mr le Pr. Pierre Jurdic	Président
Mr le Pr. Christian Drouet	Rapporteur
Mr le Pr. Etienne Weiss	Rapporteur
Mr le Dr. Régis Sodoyer	Directeur de thèse
Mme le Dr. Catherine Lachuer	Examineur
Mr le Dr. Didier Auboeuf	Examineur
Mr le Dr. Alexandre Pachot	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Secrétaire Général

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. BERNARD

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir évalué mon travail.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Catherine Legras-Fachuer, Valérie Gafa et Mathias Faure pour m'avoir suivi dans mon travail pendant ces 3 années.

Je remercie mon laboratoire d'accueil, Sanofi Pasteur, le département NCPJ, Emmanuelle Trannoy et Catherine Moste pour avoir rendu possible ce projet de thèse. Merci à Isabelle Legastelois pour son accueil au sein de sa plateforme.

Je remercie Catherine Legras-Fachuer d'avoir accepté de me suivre dans ce projet. Merci pour vos conseils.

Merci à ... Régis,

Pour avoir fait de ce projet de thèse une réalité, pour m'avoir suivi ces 4 années, pour m'avoir laissé travailler sur ton projet chouchou « les variants » sur lequel je me suis cassé les dents mais qui en valait la peine. Je te souhaite le meilleur pour la suite, professionnellement et personnellement. Tu es aux variants d'épissage, ce que Galilée est à l'astronomie ! Je te remercie pour ta passion pour la science et tes idées débordantes.

Merci également pour cette phrase qui nous a suivi, Julie et moi, et qui résume très bien ce qu'est l'aventure d'une thèse: « l'échec est le fondement de la réussite » Régis Sodoyer janvier 2012

Merci à ... Karelle,

Pour m'avoir initié au monde de l'immunologie, pour tes conseils, ta gentillesse, ta bonne humeur. Merci d'avoir amené ta pierre à l'édifice.

Merci à ... Virginie,

Pour m'avoir fait découvrir la biomole, pour tes corrections de rapport mémorables, pour tes challenges, pour ton sourire. Je n'oublierai pas tes « faut que tu manges Caro ! ».

Merci à ... Valérie,

Pour avoir si sympathiquement chamboulé ma thèse, pour avoir fait évoluer la vision du projet, pour toutes tes anecdotes improbables, ta bonne humeur. Bourriquet me suivra désormais dans d'autres aventures ! Merci pour ces quelques jours passés à Reims avec Christelle. Toute manip devient une aventure à tes côtés, j'adore !

Merci à ... Franck, Jean-Philippe, Auroro

Pour avoir partagé un pti bout d'aventure avec moi. Vous avez été extra, chacun dans votre style. Franck, parasite-man, merci d'avoir débuté l'aventure à mes côtés. Je te souhaite plein de bonheur avec ta ptite famille qui s'agrandit. Jean-Philippe, mon sauveur, jolie découverte en cette veille d'anniversaire (été 2011). Merci pour ta bonne humeur, les délires de labo, et tes boulettes !

Je te souhaite de trouver JH.F job et de t'éclater dans ce que tu fais. Aurore, une jolie complicité est née autour des JF1 et du Facs. Merci pour ton investissement et que la vie lyonnaise t'ouvre ses bras !

La team variant n'aura cessé d'évoluer, de grandir, de rétrécir. Les filles vous aurez eu chacune votre bébé pendant mon passage à Sanofi...je vous souhaite plein de bonheur. C'est un joli projet que je laisse entre vos mains en espérant qu'un jour, vous pourrez lui donner une suite. Je vous remercie toutes les 2, j'ai beaucoup appris à vos cotés.

Merci...à Julie,

Ma blonde préférée, ma coloc de bureau. J'ai apprécié toutes nos conversations, nos confidences, nos partages de chocolat et de tictac, nos fausses joies, nos smileys, nos peurs de refaire les manip 2 fois. Félicitation pour cette jolie thèse, tu m'auras tout appris sur la grippe ! Je ne saurai oublier ces soirées musicales, craquage, et cette odeur d'œuf en arrivant le matin dans le bureau. J'aurai beaucoup appris avec toi, scientifiquement et personnellement. Merci pour tes questions existentielles sur les œufs embryonnés, sur le CO₂ dans la culture cell, sur le fonctionnement d'une pipette (joli en fin de thèse !), sur le nombre de pattes que possèdent les insectes (merci Wikipedia), et non, les vaches ne sont pas carnivores !

Merci miss, sans toi ca n'aurait pas été pareil !

Je te souhaite le meilleur pour la suite, et surtout un super pti boy. Que ta nouvelle vie à 3 soit une réussite.

Merci à ... Sara

Pour avoir partagé un pti bout de bureau quelques temps. Je te souhaite une bonne continuation, plein de découvertes et plein de publiés. Good luck for the future !

Merci aux...Biomoleuses

Isabelle, G^é, Steph, Corinne, Sophie, Alex, Claire, Natacha, Charlotte... Pour tous vos conseils, pour ces moments partagés au labo, pour vos coups de boost quand les résultats n'étaient pas au rendez-vous, pour ce super souvenir de Catherinette, pour les flashs biomol, pour quelques mojitos et verres partagés, pour tout ce que vous êtes...ne changez rien, je vous adore !

Merci aux...Immunos

Marie-Jeanne, Véro, Caro, Aurélie...Merci pour votre gentillesse, ces petits moments partagés, pour m'avoir accueilli dans votre bureau à mon arrivée, et pour vos conseils. J'aurai aimé travailler plus avec vous, partager votre passion...Que la suite soit la plus belle possible pour vous. Aurélie, ton prince charmant n'est pas loin, j'en suis sûre !

Merci à ... tous les sourires croisés pendant ces 4 ans,

Notamment Céline, Arnaud, Olivier, Aurélie (M), Nico, Marine, Delphine qui ont égailé leur passage.

Merci à ... tous les habitants du bâtiment X,

Pour un bonjour, un sourire, un café, une discussion dans les couloirs, un conseil...pour tout ce qui fait de ce bâtiment un monde si spécial !

Merci aux ... Bioinfos

À Jean-Baptiste, Nadège et Yves. Merci Nadège pour ta détermination sur le NGS, pour tes conseils, pour le partage de la stagiaire de l'année ! Quelle ambiance dans ce bureau ! Gardez votre bonne humeur même si quelques trouble-faits s'incrument.

Merci à ... mon témoin de cahier de labo,

Antonin, tu en as vu passer des cahiers...Merci pour ces ptites décos inattendues ;-)

Merci au ... service commun

pour votre gentillesse, vos sourires et votre disponibilité.

Merci à ... nos super assistantes

Delphine et Sabine, souriantes, vous êtes toujours là pour un conseil et un coup de main.

Merci à ... toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont encouragé tout au long de cette aventure.

Merci à ... mes amis

Aux rennais et aux lyonnais, pour leur soutien, pour m'avoir sorti de mon labo et de ma rédaction, pour ce super mariage, pour ce que vous êtes.

Un grand merci à...Ma famille

Papa et maman, pour votre soutien, pour m'avoir donné l'opportunité de faire des études, pour m'avoir soutenue sans poser de questions. Merci pour tout, pour vos conseils aussi bien stylistiques que professionnels ou personnels. Je vous adore !

Merci à vous Ben et Céline, pour avoir été là pendant ces 3 ans et pour avoir agrandi la famille. Je vous souhaite plein de bonheur et que le train Lyon-Tours et Tours-Lyon fonctionne régulièrement !

Le plus grand des merci à... mon homme

Polo, tu auras été le plus grand des soutiens. Dans les moments délicats, tu as su me donner la force de continuer et d'aller au bout. Ces 3 ans de thèse n'auront pas été faciles par la distance imposée mais à partir de maintenant nos chemins se rejoignent et resteront réunis jusqu'au bout.

J'ai haï les dimanches soirs sur les quais de la gare, mais ton sourire et ton amour m'ont fait tenir ces 3 années. Tu as toujours été à mes côtés, tu as partagé mes doutes, mes découragements mais tu as su repousser mes limites. Merci pour ce que tu es, je t'aime !

Tu es l'as de trèfle qui pique mon cœur.

Je tiens également à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de Sanofi Pasteur, et je remercie tous les acteurs de cette belle aventure.

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	acide aminés
ADN	Acide Désoxiribonucléique
ADNc	Acide Désoxiribonucléique complémentaire
AHR	Airway HyperResponsiveness
AKT	Serine-Threonine –Specific Protein Kinase
Arg	Arginine
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARNnc	Acide Ribonucléique non codant
ATP	Adénosine Triphosphate
BCG	Bacillus Calmette-Guerin Vaccine
BCR	B Cell Receptor
BCGF	B Cell Growth Factor
BSF-1	B cell Stimulating Factor 1
CBC	Cap-binding Complex
CBP	Cap-binding Protein
CD	Cellules Dendritiques
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHR	Cytokine binding Homology Region
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSF	Colony Stimulatory Factor
Cys	Cystéine
<i>Dscam</i>	Down syndrome cell adhesion molecule
eIF4E	Eukaryotic translation Initiation Factor 4^E
EJC	Exon Junction Complex
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ESE	Exonic Splicing Enhancers
ESS	Exonic Splicing Silencers
Fox	Forkhead box
Glu	Glucine
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
hnRNP	heterogenousnuclear RiboNucleoProtein
HS	Hyper Sensibilité
ICS	Inhaled CorticoSteroids
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL-4R	Interleukine-4 Récepteur
iono	ionomycine

IRF4	Interferon Regulating Factor 4
IRS	Insulin Receptor Substrate
ISE	Intronic Splicing Enhancers
ISS	Intronic Splicing Silencers
Jak	Janus kinase
kDa	kilo Dalton
kb	kilo bases
LABA	Long Acting β2 Agonistes
LPS	LipoPoly-Saccharides
MAP	Mitogen Activating Protein
MAPK	Mitogen Activating Protein Kinase
MEK	Mitogen activated Extracellular signal regulated protein Kinase
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NFY	Nuclare Factor Y
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T cells
NGD	No-Go Decay
NGS	New Generation of Sequencing
NMD	NonSense Mediated Decay
NOVA	NeuroOncological Ventral Antigen
NSD	No Stop Decay
nt	nucleotides
ORF	Open Reading Frame
PABP	PolyAdenylate-Binding Protein
PABPN1	PolyAdenylate-Binding Protein Nuclear 1
PABPC1	PolyAdenylate-Binding Protein Cytoplasmic 1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	PhosphoInositol-3 Kinase
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PTB	PolypirimidineTract-Binding Protein
PTBD	PhosphoTyrosine Binding Domain
PTC	Premature Stop Codon
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
Ras	Rat Sarcoma
RNAPII	RNA Polymerase II
RRM	RNA-Recognition Motif
RT	Reverse Transcription
S	Sérine

SF1	Splicing Factor 1
SH2	Src-Homology 2
SHIP	SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase
SHP1	SH2-containing tyrosine Phosphatase 1
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquire
SnRNP	Small nuclear RiboNucleoprotein Particule
SnRNA	Small nuclear Ribonucleic Acid
SOCS	Suppressors Of Cytokines Signalling
SOS	Son Of Sevenless
STAT	Signal Transducer and Activators of Transcription
TCR	T Cell Receptor
Tfh	Lymphocytes T follicular helper
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Th	Lymphocytes T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
TSLP	Thymic Stromal LymphoPoietin
Tyk	Tyrosine Kinase
U2AF	U2 Auxiliary Factor
UPF	UP-Frameshift protein
UTR	UnTranslated Region
VIH	Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine
W	Tryptophane
Y	Tyrosine
YY1	Ying Yang 1
4PS	IL-4 Phosphorylation Substrate

RESUME

L'interleukine-4, cytokine clef du système immunitaire, est l'une des composantes principales de la réponse humorale. Un variant d'épissage de l'IL-4 humaine, nommé IL-4 δ 2 est caractérisé par une délétion de l'exon 2. L'expression d'isoformes de cytokines peut être spécifique d'un tissu, d'un stimulus ou d'un état pathologique. Un intérêt particulier leur est accordé car leur présence ou leur niveau d'expression peut en faire des biomarqueurs potentiels de certains stades pathologiques. Ainsi, ce projet a été consacré à l'étude de l'expression et de la fonctionnalité de l'IL-4 δ 2 dans le but de mieux caractériser son rôle au sein de la réponse immunitaire.

Une étude cinétique des niveaux d'expression de l'interleukine-4 et de son variant, réalisée chez des donneurs sains, montre une expression de ces deux variants dépendante du donneur. L'étude a été poursuivie pour déterminer le type cellulaire capable de produire l'IL-4 δ 2. Ainsi, l'IL-4 δ 2 ne semble pas être exprimée par les cellules CD4+ et CD8+ à l'inverse des granulocytes.

La fonction agoniste ou antagoniste à l'IL-4, de l'isoforme δ 2, sujette à controverse, a justifié une exploration de sa fonctionnalité. Nous avons ainsi évalué la capacité de l'IL-4 δ 2 à activer les voies de signalisation de l'IL-4. Une absence d'activation de mécanismes cellulaires similaires à l'IL-4 nous suggère un potentiel rôle inhibiteur de ce variant.

Au cours du travail sur l'IL-4 δ 2, un nouveau variant d'épissage de l'IL-4 a été découvert chez l'homme. Par épissage alternatif, un nouvel exon est retenu dans l'ARNm de ce variant. L'étude de celui-ci nous a permis de proposer, pour cet ARNm, une dégradation par le mécanisme de Nonsense-Mediated Decay (NMD). Cette découverte apporte un niveau supplémentaire dans la compréhension du système de régulation de l'IL-4.

Ce sujet d'étude apporte de nouveaux éléments quant à l'expression et la fonction de l'IL-4 δ 2. De plus, l'identification d'un nouveau variant d'épissage enrichit la connaissance sur la régulation de l'expression du gène de l'*IL4*. D'une façon générale, la prise en compte des variants d'épissage des cytokines devrait permettre de mieux caractériser la réponse immunitaire, essentielle dans un contexte de vaccinologie.

MOTS CLEFS

Interleukine-4, épissage alternatif, Nonsense-Mediated Decay, système immunitaire, fonctionnalité, régulation.

LABORATOIRE D'ACCUEIL

Sanofi Pasteur, Département recherche et Développement

1541 avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile

ABSTRACT

Analysis of Interleukin-4 alternative splice variants in the study of the immune response

Interleukin-4 (IL-4) is a key cytokine driving the humoral component of the immune system. An alternative splice variant of human IL-4, deleted of the second exon and so called IL-4 δ 2 has been described. The expression of alternative splice variants is known to be tissue-specific, dependent of a particular stimulus or a pathological state. Their potential as biomarkers is of increasing interest. Thus, this project was dedicated to the functionality of IL-4 δ 2, improving characterization of the immune response.

A kinetic study on the expression levels of IL-4 and its spliced variant, conducted on healthy donors has shown to be donor-specific. The determination of the cell type able to produce IL-4 δ 2 indicated that, CD4⁺ and CD8⁺ cells were not expressing the isoform, in contrast to granulocytes.

The controversial agonist or antagonist function of IL-4 δ 2 was discussed through functionality. The ability of IL-4 δ 2 to induce the signaling pathways of IL-4 was evaluated. An absence of similar profile of activation to IL-4 suggests a potential inhibitory role of IL-4 δ 2.

During the study on IL-4 δ 2, a new alternatively spliced variant of IL-4 was discovered in humans. Upon splicing, a new exon is retained in this variant. Its functional outcome as a substrate for Nonsense-Mediated Decay (NMD) allowed bringing a new insight in the comprehension of IL-4 regulatory system.

Our work brought novel elements in the expression and functionality of IL-4 δ 2. Moreover, the discovery of a new alternatively spliced variant enriched the knowledge on the regulation pathways of *Il4* gene expression. A focus on alternatively spliced variants of cytokines is likely to clarify the complex regulation of the immune system.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	p.5
RESUME	p.8
ABSTRACT	p.9
SOMMAIRE	p.10
<hr/>	
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	p.12
<hr/>	
L'INTERLEUKINE-4	p.14
I- Les cytokines	p.14
1- <u>Les interleukines, cytokines clefs du système immunitaire</u>	p.14
2- <u>Les cytokines dans la réponse vaccinale</u>	p.17
II- L'Interleukine-4	p.19
1- <u>La structure de l'interleukine-4</u>	p.21
2- <u>Les récepteurs spécifiques de l'IL-4</u>	p.23
a. Le récepteur de type I	p.25
b. Le récepteur de type II	p.26
c. Différentes voies de signalisation	p.27
a) <u>La cascade JAK/STAT</u>	p.27
b) <u>Les cascades IRS/PI3K et IRS/MAP</u>	p.29
3- <u>La régulation de l'expression du gène de l'IL 4</u>	p.30
4- <u>Les variants d'épissage de l'Interleukine-4</u>	p.34
a. La structure de l'IL-4 δ 2	p.35
b. Etude de la fonction de l'IL-4 δ 2	p.36
5- <u>Les maladies associées à l'IL-4</u>	p.37
a. Le cas de l'asthme	p.38
a) <u>L'asthme, une maladie inflammatoire pulmonaire</u>	p.38
b) <u>Les traitements en cours de développement</u>	p.39
b. L'IL-4 et le VIH	p.40
c. L'implication de l'IL-4 dans la tuberculose	p.41
a) <u>Les profils de cytokines pour les différentes phases d'infection</u>	p.42
b) <u>Le traitement contre la tuberculose</u>	p.43

L'ÉPISSAGE DES ARN messagers	p.44
I- L'épissage	p.44
1- <u>Le mécanisme d'épissage</u>	p.46
2- <u>L'épissage alternatif</u>	p.50
II- La régulation de l'épissage	p.52
III- Une régulation spécifique : le nonsense-mediated decay	p.56
1- <u>Un codon stop prématuré</u>	p.56
2- <u>La dégradation de l'ARNm au cours du processus NMD</u>	p.60
IV- Les maladies associées à l'épissage alternatif	p.60
V- Les cytokines, fortement touchées par l'épissage alternatif	p.62

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	p.63
-------------------------------	------

RESULTATS	p.66
-----------	------

Partie I: New insights of human IL-4 δ 2 functionality as IL-4 inhibitor	p.67
Partie II: Discovery of a new alternative splice variant of Human Interleukin-4 and study of its functionality as nonsense-mediated decay	p.95
Partie III: Analyse de variants d'épissage de cytokines par NGS	p.118

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	p.120
----------------------------	-------

BIBLIOGRAPHIE	p.129
---------------	-------

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

Dans un contexte de vaccinologie, un intérêt particulier est porté au système immunitaire et à la caractérisation des réponses induites suite à l'administration d'un vaccin. La réponse immunitaire ainsi générée est analysée notamment par la détection et la quantification des cytokines produites. Certaines d'entre elles ont été décrites sous différentes isoformes issues de l'épissage alternatif. Dotées de fonctions agonistes ou antagonistes par rapport à la protéine native, ces isoformes sont également pressenties comme biomarqueurs de certaines pathologies et sont, ou pourraient même être considérées comme composant d'un traitement. L'interleukine-4, cytokine clef de la réponse humorale, est l'une d'entre elles. Cette cytokine existe sous différentes isoformes issues de l'épissage alternatif dont les fonctions sont à l'heure actuelle soumises à controverse. Dans le but de caractériser au mieux la réponse immunitaire et d'éviter des biais dans la qualification de la réponse, nous avons consacré cette étude aux variants d'épissage de l'interleukine-4 et à la détermination de leurs fonctions.

Afin de mieux appréhender les résultats, il nous est apparu important de traiter, dans cette partie introductive, du rôle de l'interleukine-4 au sein du système immunitaire et de développer les travaux déjà effectués sur les variants de cette cytokine. Au cours de ce travail de thèse de nouveaux variants d'épissage de l'interleukine-4 ont été identifiés et caractérisés par séquençage, ce qui nous a naturellement conduit à nous intéresser à la régulation de l'épissage de l'interleukine-4. Ainsi dans une deuxième partie introductive, des notions concernant l'épissage, l'épissage alternatif et la régulation de celui-ci sont développées.

Ces différentes introductions permettront d'appréhender de façon plus claire et plus critique les résultats et discussions liées à ce sujet.

L'INTERLEUKINE-4

I- Les cytokines

1. Les interleukines, cytokines clefs du système immunitaire

Les cellules du système immunitaire communiquent entre elles par l'intermédiaire de cytokines, messagers nécessaires à l'activation, la différenciation et l'homéostasie des cellules¹. Les cytokines, produites par les cellules de l'immunité innée comme par les cellules de l'immunité acquise, sont des protéines, d'une masse moléculaire comprise entre 8 et 50 kiloDalton (kDa), qui peuvent être glycosylées.

La famille des cytokines est composée de différents sous-types de protéines classées en fonction de leur action. Les facteurs nécrosant les tumeurs ou Tumor Necrosis Factor (TNF) vont réguler l'inflammation, le sommeil, la fièvre, l'hématopoïèse et la destruction osseuse. Les interférons (IFN) sont les cytokines effectrices. Avec les facteurs nécrosant les tumeurs, ils assurent la défense de l'organisme vis-à-vis des cancers et des infections virales¹. Les chimiokines, quant à elles, constituent la plus grande famille de cytokines. Leur principale fonction est l'induction de la migration de cellules inflammatoires et non-inflammatoires vers les tissus appropriés.

Les interleukines (IL) constituent l'un des groupes majeur des cytokines. Les interleukines ont été découvertes en 1972 par Gery et Waksman en tant que facteur activant les lymphocytes, et produites par les macrophages. La séquence nucléotidique de l'IL-1 humaine a été déterminée en 1984 par l'équipe de Dinarello², après clonage et séquençage d'ADN complémentaire (ADNc) transcrit à partir d'ARN messager (ARNm) issus de monocytes humains. L'équipe de Dinarello rapporte que L'IL-1 est synthétisée par les monocytes et macrophages humains après stimulation par des endotoxines. Depuis de nouvelles interleukines ont été décrites. Les premières interleukines ont été nommées ainsi par leur expressions par les leucocytes (-leukine) et par leur fonction de communication intercellulaire (inter-). Les interleukines sont aujourd'hui numérotées de l'IL-1 à l'IL-36.

Parmi elles, la superfamille de l'IL-2, composée de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21, est caractérisée par le partage d'une sous-unité de récepteur, la chaîne γ c qui joue un rôle majeur dans la prolifération et l'homéostasie des lymphocytes T¹.

Chaque cytokine agit au niveau cellulaire par fixation à un ou plusieurs récepteurs cellulaires. Ceux-ci peuvent être spécifiques ou partagés entre différentes cytokines. La fixation de la cytokine à son récepteur induit différentes voies de signalisation. La plupart des cytokines utilisent la voie de signalisation Jak/STAT (JanusKinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription) qui sera décrite pour l'interleukine-4, plus tard dans ce manuscrit. Ces voies de signalisation permettent l'activation ou l'inhibition de l'expression de gènes spécifiques. L'action des cytokines est régulée par les protéines SOCS (suppressors of cytokines signalling) qui inhibent les janus kinases, certains récepteurs de cytokines, et les molécules de signal, permettant de réguler l'action de différentes cytokines³.

La plupart des cytokines peuvent agir seules comme en présence d'autres cytokines, ceci leur permettant d'avoir des fonctions diverses sur différents types cellulaires. De par leur très courte demi-vie, leur action se fait de manière paracrine, sur des cellules proches ou de manière autocrine sur les cellules productrices, et plus rarement de manière endocrine sur des cellules éloignées. Les fonctions des cytokines peuvent être redondantes. Par exemple, l'interleukine-2 (IL-2), l'IL-4 et l'IL-6 induisent la différenciation des lymphocytes B⁴ ou encore l'IL-4 et l'IL-13 ont une action anti-inflammatoire sur les monocytes⁵.

Les cytokines sont impliquées dans la différenciation des lymphocytes T auxiliaires ou helpers (Th) naïfs en différents sous-types. Leur sécrétion par les différents sous-types de cellules Thelper permet de caractériser et de classifier ces cellules. La différenciation en ces différents sous-types est induite par des cytokines qui peuvent être similaires ou différentes des cytokines sécrétées par les cellules une fois différenciées et qui sont résumés dans la figure 1. Très longtemps, il a été question de l'équilibre Th1/Th2 régulant l'immunité cellulaire ou humorale. Les cellules Th1 sont différenciées par la présence d'IL-12 produites par les cellules dendritiques (CD) activées^{6,7}. Ces cellules Th1, caractérisées par la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α , de facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages (GM-CSF), permettent un support aux cellules T cytotoxiques⁸ ainsi qu'aux cellules phagocytaires⁷. La différenciation des T helpers naïves en population Th2 est, quant à elle, induite par l'IL-4. Cette différenciation provoque une production importante de cytokines par

les cellules Th2, telles que l'IL-4, l'IL-5, ou encore l'IL-13. Ces cytokines ont un rôle défini dans le maintien de la population Th2, dans la différenciation des cellules adjacentes et dans l'inhibition des autres sous-types cellulaires comme les Th1.

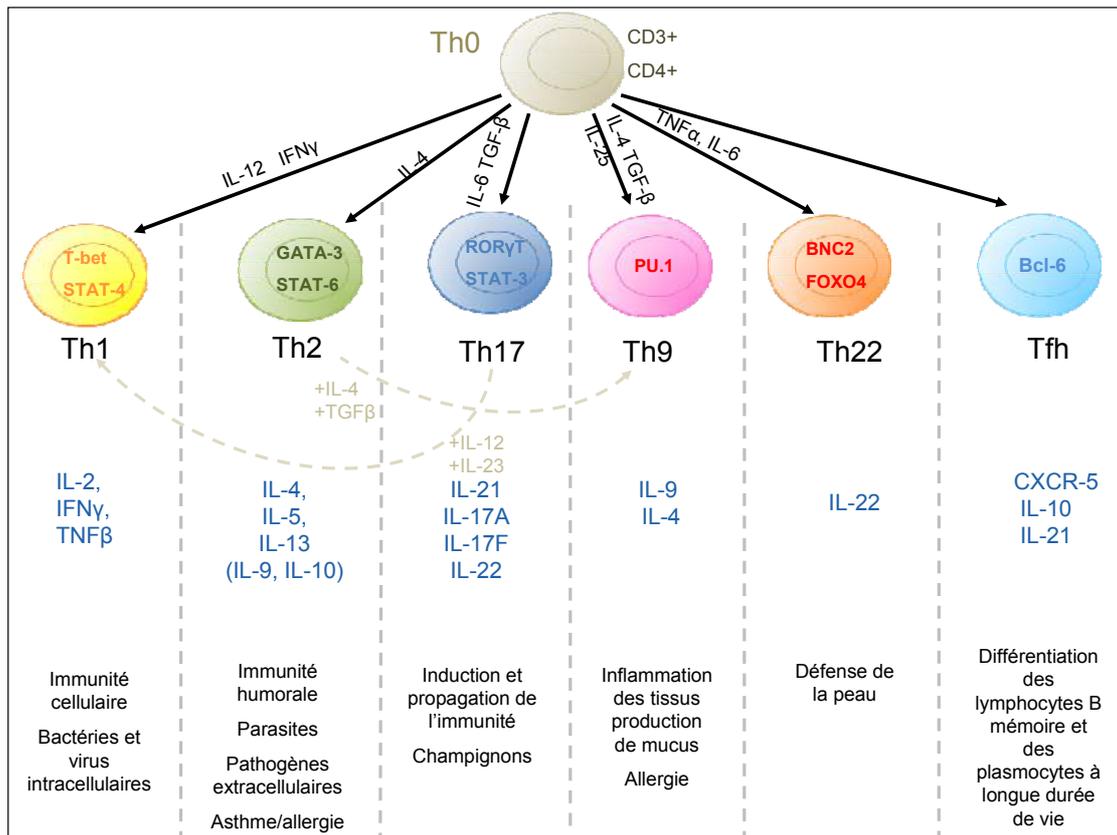


Figure 1: Représentation de la différenciation des cellules T naïves en cellules Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 ou Tfh et de leur implication dans la réponse immunitaire. Les facteurs de transcriptions sont indiqués dans les cellules, les cytokines produites dans les colonnes et les cytokines nécessaires à leur transformation sont associées aux flèches correspondant aux lignages.

Récemment, en 2005, les cellules Th17 ont été caractérisées par Langrish, par la sécrétion des cytokines IL-17⁹. Encore plus récemment, de nouveaux sous-types ont été décrits, comme les cellules Th9 (sécrétion d'IL-9), Th22 (sécrétion d'IL-22) ou les cellules folliculaires helpers (Tfh) dont les fonctions sont encore peu définies et pour lesquelles une plasticité potentielle est évoquée. La plasticité cellulaire est caractérisée par la capacité de

certaines cellules à acquérir un nouveau phénotype sous l'action de cytokines spécifiques. Par exemple, Veldhoen *et al.* ont montré en 2008 que les cellules Th2 différenciées *in vitro* peuvent être « reprogrammées » en cellules Th9 en présence d'IL-4 et de TGF β ¹⁰. Ainsi, les cellules CD4⁺ de souris déficientes en récepteur de TGF- β ainsi que les cellules déficientes en STAT-6 (Signal Transducer and Activators of Transcription, facteur de transcription activé par l'IL-4) ne sont pas capables de se différencier en sous-type Th9, contrairement aux cellules de souris « wild type ». De même, les cellules Th17, peu stables dans certains environnements vont acquérir un phénotype Th1 en présence d'IL-12 et IL-23¹¹. Initialement connue pour soutenir l'expansion et le maintien des cellules Th17, de nouvelles fonctions sont attribuées à l'IL-23. En effet, cette cytokine contribue à la présence de ces « ex-cellules Th17 » nouvellement « Th1-like » qui jouent un rôle clef dans la pathogénicité de l'encéphalomyélite allergique expérimentale par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. Ces découvertes récentes sur la plasticité des cellules prouvent une adaptation du système immunitaire à différentes situations et infections.

2. Les cytokines dans la réponse vaccinale

L'analyse de la réponse immunitaire induite par un vaccin repose sur des marqueurs permettant de suivre la mise en place d'une réponse humorale et cellulaire. Les adjuvants peuvent aider à l'orientation de cette réponse. L'étude de la réponse à un antigène vaccinal s'effectue par le dosage des anticorps produits et par la quantification des cytokines sécrétées caractéristiques des cellules immunitaires engagées dans la réponse.

Dans le cas d'une réponse humorale, les immunoglobulines (Ig) produites et sécrétées dans le sang sont estimées de façons quantitative et qualitative. Lors de l'étude chez l'animal (le plus souvent chez la souris) les isotypes sont déterminés par une séroconversion en IgG1 (correspondant à l'IgG4 chez l'homme) laissant présager majoritairement une réponse Th2 alors que les IgG2a (correspondant à l'IgG1 chez l'homme) témoignent d'une réponse Th1. Ces anticorps sécrétés dans la circulation et les fluides des muqueuses, sont produits par les lymphocytes B activés et différenciés en plasmocytes. Les lymphocytes B possèdent à leur surface un récepteur, le BCR (B cell Receptor) qui se trouve être la forme membranaire de l'anticorps produit. Les anticorps neutralisent l'antigène en se fixant à leur surface empêchant ainsi la réplication virale ou la diffusion de toxines¹². Ils aident également à la destruction des

pathogènes extracellulaires par les cellules spécialisées de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles). Enfin, ils peuvent activer le système du complément.

Le dosage des cytokines sécrétées suite à une restimulation *in vitro* des splénocytes est également une méthode très largement utilisée pour caractériser la réponse induite à l'encontre de l'antigène vaccinal. Une grande quantité de cytokines sont sécrétées par les lymphocytes T helpers, suite à l'exposition à un antigène. Parmi la grande famille des lymphocytes T helpers, les Th2 sont sollicités dans la réponse humorale mais aussi dans la défense contre les helminthes et les allergènes. Ces cellules sont caractérisées par la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et IL-25 (également appelée IL-17E)^{6,13}. Ces différentes cytokines ont un large spectre de fonctions sur les cellules immunitaires mais aussi sur différents tissus. La mise en action des cellules Th2 provoque la production d'IgG1 et IgE par l'action de l'IL-4. L'IL-5, quant à elle, induit une destruction des pathogènes par l'activation des éosinophiles⁸ et l'IL-13 soutient la sécrétion de mucus et l'hypersensibilité des voies respiratoires, symptôme ressenti notamment par les patients asthmatiques¹⁴. L'IL-9, plus faiblement produite, recrute les mastocytes dans les poumons ou les intestins et peut induire une hyperplasie mastocytaire¹³. Les cellules Th2 sont également capables de produire de l'IL-24 connue pour ses effets anti-tumoraux¹³. Toutes ces cytokines interagissent ensemble dans la mise en place du phénotype Th2 en réponse à une infection ou à un antigène vaccinal mimant une infection. L'étude de l'IL-4 dans un contexte de vaccinologie prend tout son sens en raison de son implication dans l'immunité humorale.

II-L'Interleukine-4

Un co-facteur de la prolifération de lymphocytes B de souris hautement purifié¹⁵, a été découvert en 1982. Il a naturellement été nommée facteur stimulant les cellules B (BSF-1) ou encore facteur induisant la croissance des cellules B (BCGF)⁷⁰. En 1986, un ADNc issu de lymphocytes T humains activés a été isolé et identifié comme correspondant au BSF-1 connu chez la souris. De nouvelles fonctions lui sont attribuées comme l'induction de la prolifération cellulaire T, fonction partagée par les lymphokines. Cependant ce nouvel ADNc a été distingué des facteurs cellulaires T comme l'IL-1, IL-2, l'IL-3, ou les CSF (colony stimulating factor) par sa fonctionnalité et son poids moléculaire. Ainsi, cette protéine entre dans la famille des cytokines en tant qu'interleukine-4 (ou IL-4)¹⁶. Depuis, l'étude de l'IL-4 a été approfondie. Cette cytokine, produite par les cellules du système immunitaire, est principalement sécrétée par les lymphocytes T activés (CD4+) de type Th2 mais aussi par de nombreuses cellules, mais en plus faible quantité. Ainsi, les mastocytes¹⁷ et les éosinophiles¹⁸ sont capables de sécréter de l'IL-4. Des basophiles humains purifiés produisent également de l'IL-4¹⁹ après stimulation par un anti-IgE. Leur analogue chez la souris est aussi capable d'une telle induction²⁰.

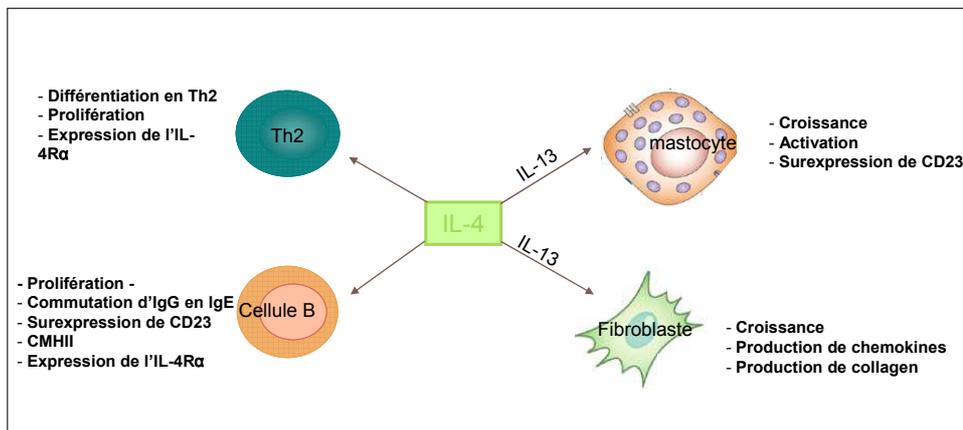


Figure 2 : Schéma représentatif des fonctions de l'IL-4 sur différents types cellulaires, parfois en combinaison avec une autre cytokine.

Au cours du temps et des études réalisées sur l'IL-4, un large spectre de fonctions lui est attribué sur différents types cellulaires. Cette cytokine pleiotropique, régulatrice de l'immunité (figure 2), est principalement connue pour son rôle Th2, son implication dans la

lutte contre les infections parasitaires, ainsi que dans les dérives immunitaires comme l'allergie. L'IL-4 induit ainsi la prolifération et la différenciation des lymphocytes Thelper naïfs en phénotype Th2, qui expriment notamment le récepteur à l'IL-4 (IL-4R α) à leur surface²¹. La réponse pro-inflammatoire Th1 en est ainsi diminuée par l'inhibition de l'activation des macrophages et de la production des cytokines Th1 (IL-1, TNF- α et IFN- γ)²¹. L'IL-4 agit également en collaboration avec l'IL-13 dans le recrutement et l'activation des lymphocytes B et induit un changement de la classe d'immunoglobuline passant ainsi d'IgM à IgG4 et IgE²². En conséquence, le récepteur à l'IgE, CD23, est surexprimé à la surface des mastocytes et des lymphocytes B²³⁻²⁵. La présence d'IL-4 induit l'expression des molécules du CMH de classe II²⁶, LFA1 et LFA3 (Leukocyte Fonction Antigen) ainsi que celle du récepteur à l'IL-4 à la surface des cellules B²⁷. L'intensification de la réponse en IgE induite par l'IL-4, permet à cette cytokine d'être considérée comme cible préférentielle des traitements contre les allergies. L'IL-4 et l'IL-13 ont des fonctions communes et agissent souvent en collaboration. Ces deux cytokines permettent notamment la prolifération des fibroblastes, la chimiotaxie et la production de matrice extracellulaire²⁷ comme l'hypersécrétion de mucus par les cellules épithéliales²², ainsi que la production de collagène par les fibroblastes²⁸. Ces cytokines sont également impliquées dans l'inhibition de l'expression de cyclo-oxygénase-2 induite par les LPS et la sécrétion de prostaglandine E2 dans les monocytes²⁹.

Les nématodes gastro-intestinaux induisent un changement dans le système immunitaire de leur hôte provoquant un état d'immunosuppression qui favorise l'installation du parasite³⁰. Ils induisent un mécanisme impliquant l'IL-4 et l'IL-13 qui activent les mastocytes intestinaux^{27,30}, les cellules de goblet et les cellules épithéliales³⁰⁻³² permettant la production de mucus et la contraction des cellules de muscle lisse³⁰. De plus, lors d'une infection parasitaire, une élévation de la quantité d'IL-17 contribue à l'inflammation et à la destruction des tissus. L'émission d'un signal par l'IL-4 récepteur provoque une réduction du niveau d'IL-17 et stimule le développement de macrophages qui vont induire une reconstruction tissulaire³¹.

De part ses fonctions et comme d'autres cytokines Th2, l'IL-4 est impliquée dans la tolérance envers une greffe d'organe²¹ car elle permet l'inhibition d'un mécanisme immunitaire envers le corps étranger induit par la voie Th1.

En raison de son rôle important dans le système immunitaire, il est surprenant d'apprendre qu'aucune lignée cellulaire T non transfectée ne soit capable de produire de l'IL-4³³. Il est à noter un point de contradiction concernant la production d'IL-4 *in vitro*. En effet, le groupe de William Paul indique que l'IL-4 est nécessaire à l'initiation de la différenciation Th2^{34,35} *in vitro* alors que Mark Ansel indique que cette activation peut se faire en absence d'IL-4³⁶. On sait que l'IL-4 renforce son expression de manière autocrine et paracrine. Cependant l'induction Th2 *in vitro* est discutée mais le maintien du phénotype est dépendant de l'IL-4. Ce cas nous indique que les mécanismes d'induction de l'IL-4 ne sont pas encore totalement élucidés et que l'environnement cellulaire contribue nettement à la production de cette cytokine.

1. La structure de l'interleukine-4

Le gène codant pour l'interleukine-4 est positionné chez l'homme sur le chromosome 5q31.1 (figure 3). Le gène de l'IL-4 est situé à 25kilobases (kb) de distance³⁷ de celui de l'IL-13. On retrouve également à proximité, les gènes codant pour l'IL-5, l'IL-3, l'IL-9 et le GM-CSF³⁸.

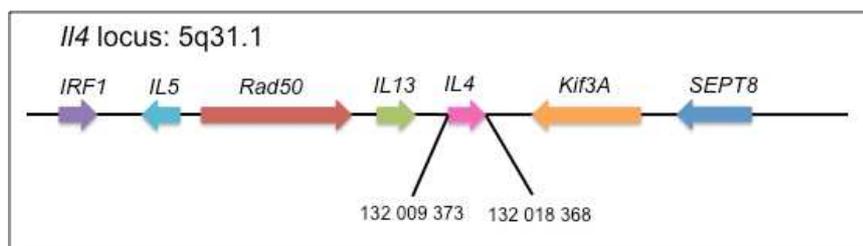


Figure 3 : Locus de l'IL-4 en position 5q31.1 sur le génome humain. Les différents gènes sont représentés par des flèches dont l'orientation indique le sens du gène sur le chromosome. Les positions de début et de fin de gène de l'IL-4 sont indiquées.

Le gène de l'interleukine-4, long de 8996 nucléotides (nt), est composé de 4 exons et de 3 introns. Son ARN messager est constitué de 921nt divisés en une partie 5' UTR (Untranslated Region) (370nt), une séquence codante (462nt) et une séquence 3'UTR (89nt) (figure 4). La séquence codante est quant à elle constituée d'une séquence signal de sécrétion

(72nt) et d'une séquence correspondant au peptide mature (390nt). Le messager est traduit en une glycoprotéine de 153 acides aminés (aa), dont la séquence signal (24aa) est clivée lors de la sécrétion. Le peptide mature est ainsi composé de 129aa ce qui correspond à une protéine de 15 à 17 kDa²⁷ en fonction de la glycosylation. Un seul site de N glycosylation se situe sur l'acide aminé 62 (figure 4).

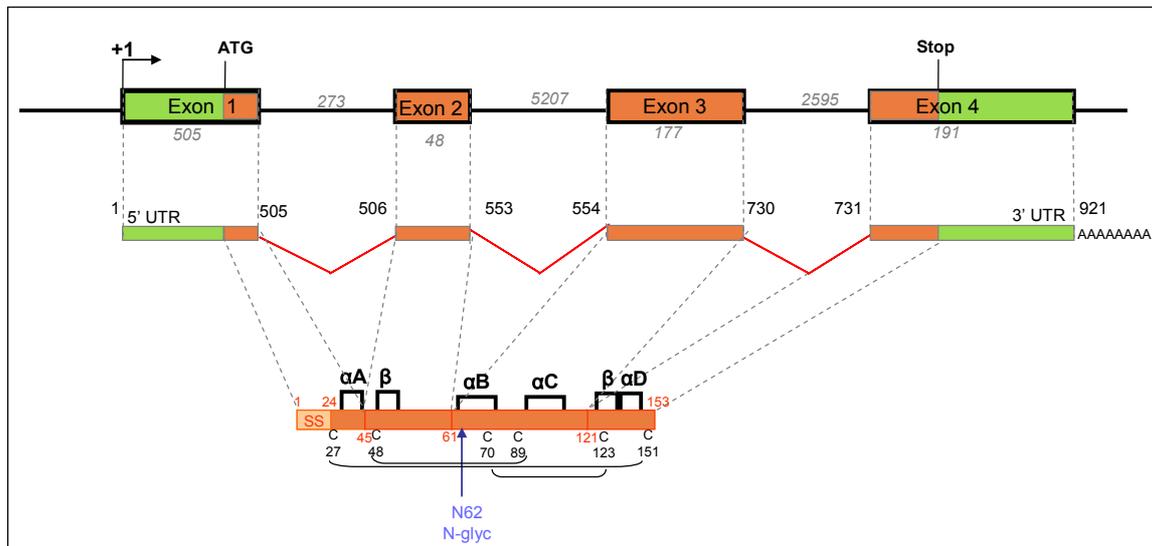


Figure 4 : Le gène de l'IL-4 est composé de 4 exons et de 3 introns dont les tailles sont indiquées en gris italique. Ce gène est transcrit en un ARNm de 921 nucléotides. Cet ARNm est composé des 4 exons dont les positions des nucléotides de début et fin sont notés en noir. L'ARNm est ensuite traduit en protéine. Les hélices α et les feuillets β de la structure secondaire sont annotés ainsi que la séquence signal (SS). Les ponts disulfures sont également représentés par un trait reliant 2 cystéines (C) avec les positions de celles-ci. Un site de glycosylation à la position 62 est présent sur la protéine IL-4.

La structure de la protéine IL-4 a été déterminée par diffraction des rayons X et par RMN³⁹, indiquant une composition de 4 hélices α et un feuillet β ⁴⁰ (numérotation des acides aminés sans compter le peptide signal) (figure 5):

- hélice A : nucléotides 4 à 19
- hélice B : nucléotides 40 à 60
- hélice C : nucléotides 70 à 94
- hélice D : nucléotides 109 à 126
- 2 brins anti-parallèles du feuillet β : nucléotides 27 à 31 et 105 à 108

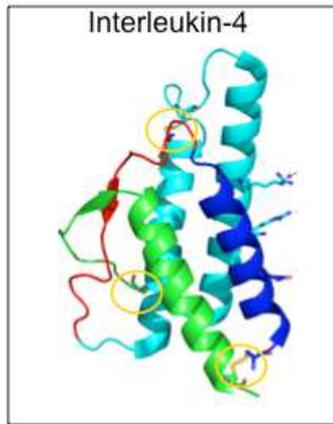


Figure 5: Structure secondaire de l'IL-4. Les exons sont montrés par des couleurs différentes (exon1 : bleu foncé, exon 2 : rouge, exon 3 : cyan, exon 4 : vert). Les 3 ponts disulfures de cette protéine sont entourés en jaune.

L'arrangement structural de la protéine est basé sur un modèle up-up-down-down contenant 3 ponts disulfures et aucun résidu cystéine libre : Cys₃-Cys₁₂₇, Cys₂₄-Cys₆₅ et Cys₄₆-Cys₉₉^{40,41} (numérotation sans le signal peptide).

L'interleukine-4, en tant que protéine, a une durée de vie assez courte, de quelques heures environ^{42,43}.

2. Les récepteurs spécifiques de l'IL-4

L'interleukine-4 se fixe à son récepteur spécifique : l'IL-4R α découvert chez la souris en 1988 par Howard⁴⁴. Le récepteur humain aussi appelé CD124, avec un poids moléculaire de 140kDa, est composé de 825 acides aminés répartis en un domaine extracellulaire (207aa), un domaine transmembranaire (24aa) et un domaine intracellulaire (569aa)⁴⁵. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs de cytokines de type I pour lesquels le domaine extracellulaire contient 4 cystéines ainsi qu'un motif WSXWS (Tryptophane – Sérine – X - Tryptophane – Sérine). Ces résidus sont responsables de l'intégrité de la structure des récepteurs et servent également de motif de reconnaissance pour l'interaction cytokine/récepteur. Ces domaines forment une partie hautement conservée dans différents récepteurs, nommé « cytokine binding homology region (CHR) »^{22,46} (figure 6). La partie cytoplasmique du récepteur, quant à elle, contient 5 tyrosines Y₄₉₇ (faisant partie du motif

I4R), Y₅₇₅, Y₆₀₃, Y₆₃₁ et Y₇₁₃ (faisant partie du motif ITIM)^{45,46} ainsi que deux régions conservées : une région acide et la box1, région riche en proline (figure 6).

Lors de l'activation du récepteur par la fixation de l'IL-4, les kinases de la famille Janus se fixent sur la box 1 et à la région acide induisant la phosphorylation des 5 résidus tyrosines. Une fois phosphorylées, ces tyrosines agissent comme des plateformes pour l'interaction de différentes protéines impliquées dans la voie de signalisation par l'intermédiaire de leur domaine PTBD (Phosphotyrosine binding domain)²⁸ ou du domaine SH2 (Src-homology 2)⁴⁶.

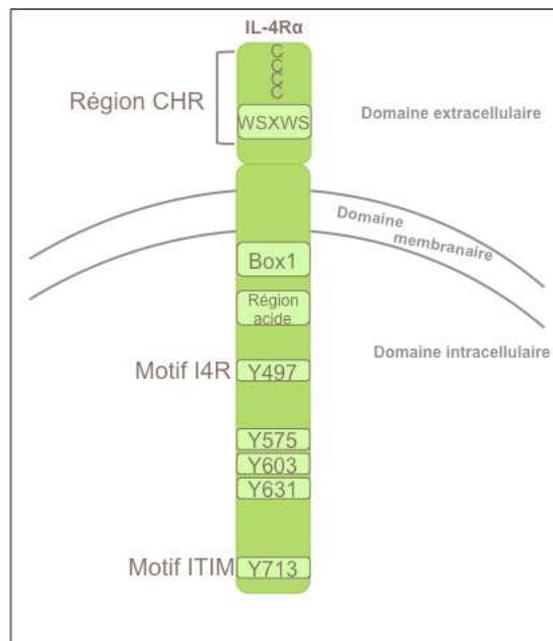


Figure 6 : l'IL-4R α est composé de 3 domaines : extracellulaire, membranaire et intracellulaire. Le domaine extracellulaire contient 2 régions conservées (4 cystéines et la région WSXWS) qui constituent la région « cytokine binding homology région (CHR) ». Dans le domaine intracellulaire, différentes régions conservées et fonctionnelles sont présentes : la box1, la région acide, le motif I4R qui contient la tyrosine Y497, 3 tyrosines (Y575, Y603 et Y631) et le motif ITIM qui contient la tyrosine Y713.

L'IL-4R α a été décrite sous 2 formes : une forme membranaire et une forme soluble. La forme membranaire permet l'action de la voie de signalisation Jak/STAT tandis que la forme soluble induit un rétro contrôle négatif. Son rôle inhibiteur au niveau de la fixation de l'IL-4 sur le récepteur membranaire, a lieu par un effet de compétition sur la fixation de l'IL-4 sur ces deux récepteurs. Le récepteur soluble est produit de deux manières : soit par épissage alternatif démontré par Northern Blot par Kruse *et al.*⁴⁷, soit par clivage de la forme

membranaire, démontré par absence d'ARNm correspondant à la présence du récepteur soluble prouvant sa production par clivage⁴⁸.

L'IL-4R α est présent sur les cellules hématopoïétiques, endothéliales, épithéliales, les cellules du muscle lisse et les fibroblastes. Le récepteur de l'IL-4 est présent sur les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques, en raison de 100 et 5000 récepteurs à leur surface⁴⁴. Ces valeurs sont similaires à celles observées pour le récepteur de l'IL-2 sur les cellules T et B. L'affinité entre l'IL-4 et son récepteur l'IL-4R α est très forte (Kd 20 à 300pM)⁴⁶ et se fait par l'intermédiaire de 2 sites majeurs : Glu9 (hélice A) et Arg88 (Hélice C) (numérotation sans le signal peptide)^{22,40}. Une fois l'IL-4 fixée à son récepteur, l'IL-4R α est capable de former un hétéro-dimère avec la chaîne γ c⁴⁹ (CD132) pour donner le récepteur de type I ou encore avec l'IL-13R α 1 (CD213a1), pour constituer le récepteur de type II.

i. Le récepteur de type I

Le récepteur de type I se compose d'une sous-unité α (IL-4R α) ayant une affinité pour l'IL-4 et de la chaîne γ c (figure 7) qui est commune aux récepteurs à l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21²².

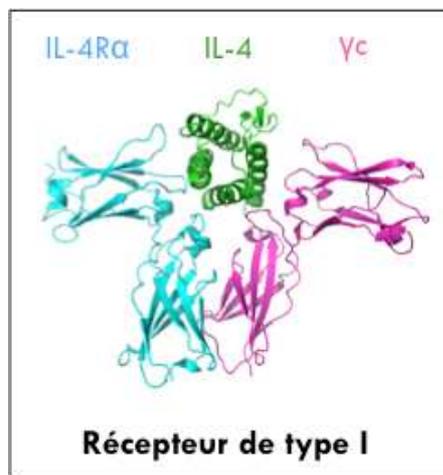


Figure 7 : IL-4 récepteur de type I composé de l'IL-4R α (Bleu), de la chaîne γ c (rose) et de l'IL-4 (vert)

Ce récepteur est présent à la surface des cellules hématopoïétiques et en particulier les lymphocytes T et B. La chaîne γ c, contrairement à l'IL-13R α 1, a été décrite sur les cellules T et naturelle tueuses (NK)⁵⁰. L'affinité de l'IL-4 pour son récepteur se fait quasi exclusivement par la chaîne α ⁴¹. En effet, Kraich *et al.* ont analysé l'affinité entre la chaîne γ c et l'IL-4,

celle-ci se trouve être trop faible pour être détectée au Biacore⁵¹. Si la chaîne γ c ne contribue que très peu à la fixation de l'IL-4, elle n'en est pas moins essentielle au déclenchement du signal^{45,49}. En effet, la signalisation de l'IL-4 par son récepteur de type I a été étudiée sur la lignée cellulaire murine L cell déficientes en chaîne γ c. Ces cellules n'induisent pas la phosphorylation d'IRS2 en présence d'IL-4 alors que quand ces mêmes cellules sont transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc codant pour la chaîne γ c, induisant son expression à la surface cellulaire, IRS2 est phosphorylée par l'IL-4⁴⁹. Ce récepteur de type I est principalement impliqué dans le développement des cellules Th2. L'IL-4 induit, notamment à la surface des lymphocytes T, l'augmentation de l'IL-4R α et ceci de manière autocrine.

ii. Le récepteur de type II

Le récepteur de type II est composé de la sous-unité IL-4R α et de la sous-unité IL-13R α 1 (figure 8). L'IL-4 possède 25% d'homologie avec l'IL-13, ce qui leur permet de partager un récepteur commun (IL-4R α et l'IL-13R α 1) et d'avoir de nombreuses activités biologiques communes²² sur les monocytes, les mastocytes et les lymphocytes B. Ce récepteur de type II n'est pas présent à la surface des cellules T²², en revanche il est exprimé à la surface des cellules non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales, endothéliales ou fibroblastes ainsi que sur les cellules hématopoïétiques de la lignée myéloïde comme les macrophages et les basophiles^{22,24,46}. On retrouve également ce récepteur à la surface des lymphocytes B dont la plupart expriment la chaîne γ c et l'IL-13R α 1⁵⁰.

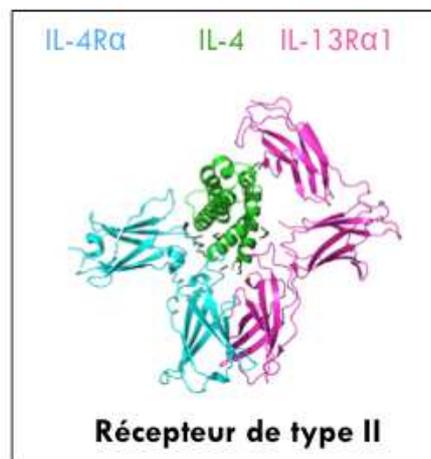


Figure 8 : IL-4 récepteur de type II composé de l'IL-4R α (Bleu), de l'IL-13R α 1 (rose) et de l'IL-4 (vert).

Alors que l'IL-4 se fixe au domaine extracellulaire de l'IL-4R α avec une forte affinité, aucune affinité n'est détectable entre l'IL-4 et l'IL-13R α 1³⁰. Le récepteur IL-13R α 1 contient un domaine « immunoglobulin-like » en N-terminal, absent dans la structure de la chaîne γ c. Ce domaine est nécessaire pour l'émission d'un signal par l'IL-13 mais pas par l'IL-4^{21,23}.

Il existe un second récepteur à l'IL-13 nommé IL-13R α 2 qui se trouve être un « Decoy » récepteur jouant un rôle de leurre à la surface des cellules, dans ce cas aucun signal intracellulaire n'est émis²³.

Certaines cellules comme les macrophages et les cellules dendritiques expriment les 2 récepteurs, ce qui les rend capables de répondre à l'IL-4 comme à l'IL-13.

iii. Différentes voies de signalisation

La formation d'un complexe cytokine-récepteur induit différentes voies de signalisation intracellulaire. La voie Jak/STAT (Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription) permet la différenciation cellulaire tandis que les voies IRS/PI3K (Insulin Receptor Substrate / PhosphoInositol-3 Kinase) et IRS/AKT (Insulin Receptor Substrate / Serine-Threonine-Specific Protein Kinase) permettent la croissance et l'homéostasie cellulaire.

a) La cascade JAK/STAT

Les deux récepteurs de l'IL-4 induisent un signal par l'intermédiaire d'une cascade Jak/STAT. L'IL-4R α s'associe avec Jak1, la chaîne γ c avec Jak3 et l'IL-13R α 1 avec Jak2 et Tyk2 (Tyrosine Kinase 2)^{21,23,50}.

L'hétérodimerisation du récepteur de l'IL-4 avec la chaîne γ c à la surface de la cellule permet la fixation de Jak1 et Jak3 sur les box1 de ces deux chaînes. Les kinases sont alors trans-phosphorylées et peuvent ensuite phosphoryler les trois tyrosines (n°2 à 4) (Y₅₇₅, Y₆₀₃, Y₆₃₁) de l'extrémité cytoplasmique C-terminale. Dans le cas du récepteur de type II, Jak2 et Tyk2 ne sont phosphorylées qu'après fixation de l'IL-13R α 1.

Les 3 tyrosines phosphorylées recrutent STAT-6 et servent de plateforme pour sa phosphorylation par les Janus Kinases et Tyrosine Kinases (figure 9). STAT-6 interagit avec les tyrosines par son domaine SH2. La phosphatase SHP-1 (SH2-containing tyrosine phosphatase-1) agissant comme régulateur de STAT-6. SHP-1 déphosphoryle STAT-6 par interaction avec le cinquième résidu de la chaîne IL-4R α (Y713)²⁸. Lorsque STAT-6 est phosphorylé, il change de conformation ce qui permet sa dimérisation, puis sa translocation

nucléaire et sa fixation à l'ADN pour activer la transcription de gènes cibles tels que ceux codants pour l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, ainsi que GATA3 et c-maf qui sont des facteurs de transcription spécifiques des cellules Th2. STAT-6 et GATA3 répriment l'expression des gènes de l'IFN γ dans les cellules Th2⁵².

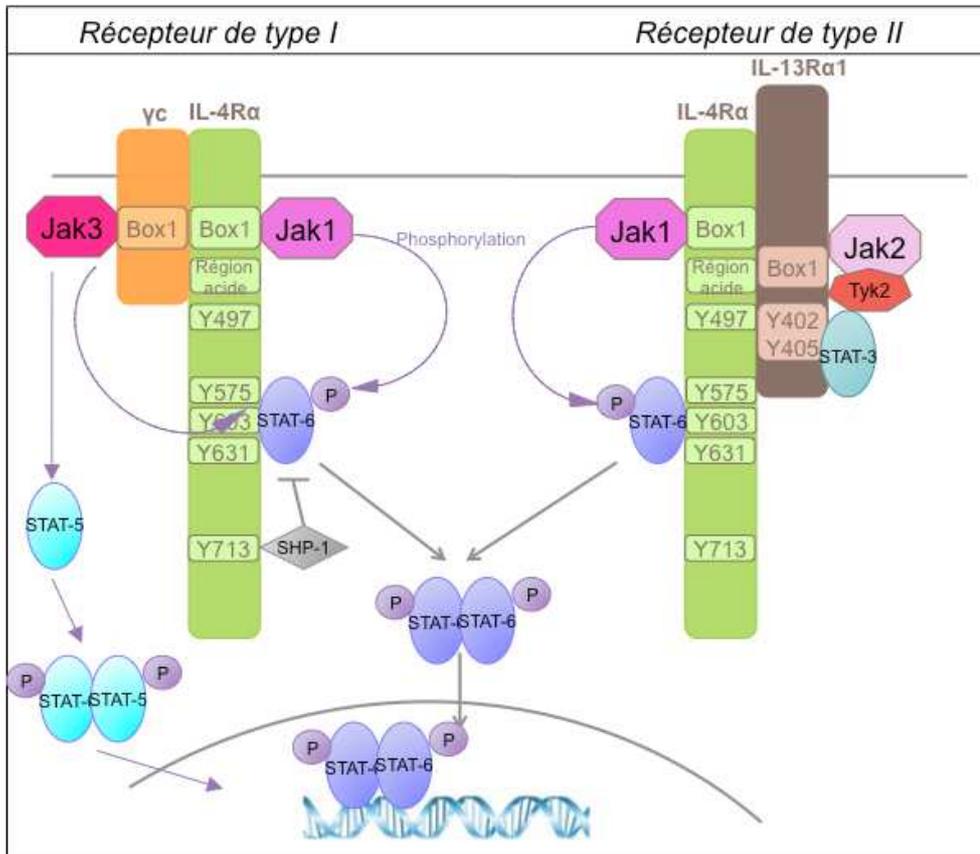


Figure 9 : représentation de la voie JAK/STAT. L'IL-4 active STAT-6 en se fixant au récepteur de type I ($IL-4R\alpha$ + chaîne γ notée γc) ou au récepteur de type II ($IL-4R\alpha$ + $IL-13R\alpha1$). STAT-6 est phosphorylé par $Jak1/Jak3$, se dimérise, est transloqué vers le noyau, et se fixe sur les gènes cibles de l'ADN.

Le rôle de STAT-6 dans la signalisation de l'IL-4 a été montré sur des souris déficientes en STAT-6 dans lesquelles la présence d'IL-4 n'induit pas la prolifération et la différenciation des lymphocytes T⁴⁵. De plus, STAT-6 aide à la production d'IgE, à l'expression de CD23 et à la présentation du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II par les cellules B³⁸.

Les protéines SOCS sont des protéines régulatrices des voies de signalisation Jak/STAT induisant une modulation négative. Ces protéines sont produites dans les premières heures après stimulation par les cytokines. L'une d'entre elles, SOCS-1, a été identifiée

comme un inhibiteur de la phosphorylation de STAT-6 induite par l'IL-4 en agissant sur l'activité des Janus kinases²⁶. Il est intéressant de noter que l'expression de SOCS-1 dans la moelle épinière de souris est induite notamment par l'IL-4²⁶.

La signalisation de l'IL-4 par le récepteur de type II induit la même voie Jak1/STAT-6 par l'intermédiaire de la chaîne IL-4R α (figure 9). D'un autre côté, le domaine cytoplasmique de l'IL-13R α 1 contient 2 tyrosines (Y402 et Y405) qui permettent la fixation de STAT-3. Différentes études ont montré que l'activation de STAT-3 a lieu en réponse à l'IL-4 et l'IL-13 dans les lymphocytes B^{53,54} et dans les cellules cancéreuses⁵⁵. Son rôle reste cependant indéterminé. Une étude récente montre que STAT-3 serait impliqué dans la différenciation Th2⁵⁶.

Un autre facteur de transcription, STAT-5, peut également être activé par l'IL-4 dans une moindre mesure. Ce facteur se fixe sur la chaîne γ c du récepteur de type I sur les cellules T préactivées^{57,58}. STAT-5 est phosphorylé par Jak3. Cette signalisation semble intervenir dans des processus basiques de la cellule comme la différenciation et la croissance cellulaire.

b) Les cascades IRS/PI3K et IRS/MAP

Les molécules IRS ont tout d'abord été identifiées comme des protéines phosphorylées en réponse à l'insuline. La phosphorylation de la tyrosine Y497 située dans la région cytoplasmique de l'IL-4R α induit la fixation et la phosphorylation de 4PS (IL-4 phosphorylation substrate)/IRS-2 dans les cellules hématopoïétiques et IRS-1 dans les cellules non hématopoïétiques^{45,59}.

La fixation de l'IL-4 au récepteur induit l'activation de Jak1 et Jak3 puis la phosphorylation de l'IL-4R α . IRS1 et 2 sont ensuite recrutés par Y497 du récepteur où ils sont phosphorylés par Fes. IRS-1 et IRS-2 activent 2 voies de signalisation : PI3K et Ras (Rat sarcoma)/MAP (mitogen activating protéine)²⁶ (figure 10). Celles-ci confèrent à la cellule une protection contre l'apoptose et permet sa prolifération²⁴.

L'activation d'IRS-2 induit l'activation de PI3K en se fixant à sa sous-unité p85. PI3K régule des kinases impliquées dans la survie cellulaire²⁸. La protéine serine/thréonine kinase Akt est ensuite activée inhibant ainsi les signaux d'apoptose. La voie de signalisation PI3K est régulée par les protéines SHP-1 et SHIP (SH2-containing inositol 5'-phosphatase), qui se fixent sur le motif ITIM (inhibitory motif) au niveau de la position Y713, pour déphosphoryler les molécules de signal^{26,60}.

IRS-1 et IRS-2 sont capables de fixer la protéine Grb-2 qui s'associe à SOS (Son Of Sevenless), un activateur de Ras. La voie de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) est initiée par la sérine/thréonine kinase Raf, suite à son activation par Ras. Raf phosphoryle MEK (Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase) qui induit la phosphorylation et l'activation d'ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases). Cette voie de signalisation induit la croissance et la survie de nombreux types cellulaires⁵⁰.

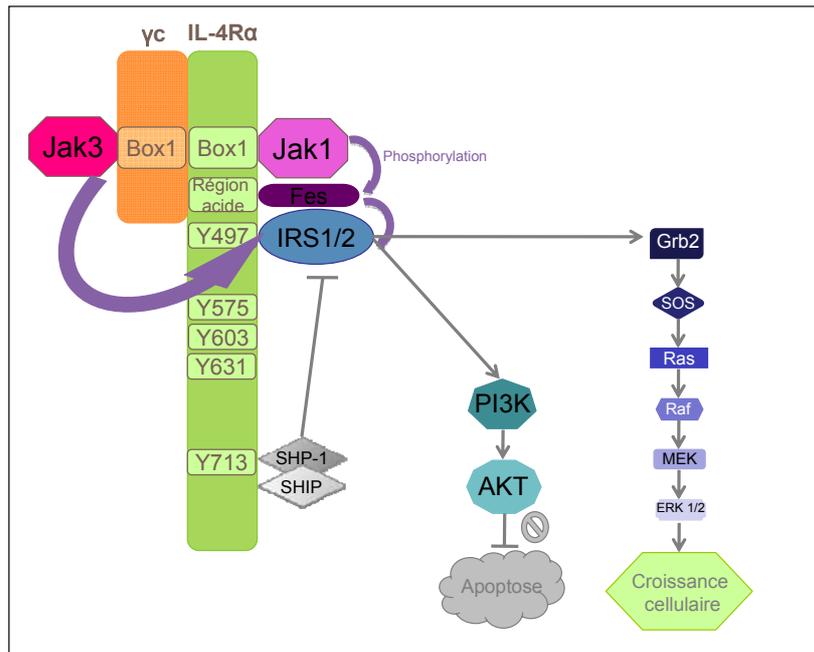


Figure 10 : En se fixant à son récepteur, l'IL-4 active Jak1 et Jak3 qui phosphorylent Fes. Fes phosphoryle IRS1/2 situé sur la plateforme Y497. IRS1/2 peut activer 2 voies : l'une activant PI3K et inhibant l'apoptose cellulaire, la deuxième activant Grb2 et Ras/ERK menant à la croissance cellulaire.

3. La régulation de l'expression du gène de l'IL4

Les cellules dendritiques ayant reconnu une bactérie ou un virus sont capables d'induire une différenciation des cellules T naïves en Th1 par activation cellulaire et co-production d'IL-12 et d'IL-23. La différenciation Th2 est, quant à elle, induite par un contact entre les cellules dendritiques et les cellules T en absence de ces cytokines. Il s'avère, cependant que l'IL-4 est absolument nécessaire à sa propre production par les cellules T³³. La première source d'IL-4 permettant la différenciation des cellules T en Th2 reste encore mal connue. Les sources potentielles d'IL-4 peuvent être les mastocytes, les basophiles, les

éosinophiles, les cellules naturelles tueuses (NKT) et des Th2 précédemment différenciées. La complexité de cette différenciation a notamment été montrée par l'utilisation de souris déficientes en IL-4 ou STAT-6 pour lesquelles la différenciation Th2 est toujours possible sans impact sur le phénotype des cellules Th2⁶¹. L'IL-4 et STAT-6 sont cependant nécessaires pour une réponse induisant l'activation et la migration d'éosinophiles, l'activation des cellules B et la production d'IgE⁶¹. L'IL-4 bloque la différenciation Th1 par l'intermédiaire de STAT-6 qui inhibe la transcription des gènes cibles Th1. De plus GATA-3, exprimé suite à l'activation de STAT-6, réprime l'expression de STAT-4, induite par l'IL-12 et menant au développement d'une réponse Th1⁶². L'expression spécifique du facteur de transcription c-maf qui induit une transcription maximale du gène de l'IL-4, est également responsable de la forte expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) qui se développe sur les cellules Th2 comparé aux cellules Th1³⁶. STAT-5 semble fortement impliqué dans la différenciation Th2 *in vivo*. En effet, l'activation du TCR induit une augmentation de l'expression de GATA-3 ainsi que la production d'IL-2 qui ensuite, active STAT-5. La combinaison de l'expression précoce de STAT-5 et de GATA-3 peut ensuite induire la production d'IL-4. Cette première production d'IL-4 est dépendante de l'activation du récepteur cellulaire T (TCR) mais indépendante de la présence d'IL-4³⁴. Ceci a été montré par un traitement de souris infectées avec le parasite *Trichuris muris* et une injection d'anticorps anti-IL-2 qui induit une impossibilité de réponse Th2 envers l'helminthe³⁴. Les signaux de l'IL-2 transmis par STAT-5 stabilisent l'expression du gène de l'IL-4 en développant les cellules Th2 indépendamment des effets de l'IL-2 sur la survie et la croissance cellulaire. La signalisation de l'IL-2 par STAT-5 favorise également la voie Th2 par rapport à la différenciation Th1 par augmentation de l'expression de SOCS3, un inhibiteur de l'activation de STAT-4 par l'IL-12³⁶. Cependant STAT-5 peut être activé par différentes cytokines : l'IL-2, l'IL-7 et la thymic stromal lymphopoietin (TSLP). TSLP peut agir sur les cellules dendritiques, ce qui induit une surexpression des récepteurs à l'IL-25 sur les cellules Th2. Il a été montré que l'IL-25 joue un rôle dans l'expansion Th2 et l'expression de GATA-3. Mais TSLP peut également agir directement sur les cellules CD4+ provoquant leur différenciation en Th2. L'induction de TSLP par les pathogènes et allergènes n'est à l'heure actuelle pas bien connue. Une fois la quantité d'IL-4 précoce suffisante, un signal induit par la voie de signalisation de l'IL-4R/STAT-6 permet d'augmenter la production de GATA-3³⁴.

La structure de la chromatine est un facteur important pour la régulation des gènes. En effet, la chromatine du locus de l'*Il4* (comprenant le gène de l'*Il13* notamment) subit des

changements pendant la différenciation des cellules Thelper³⁶. La première transcription de l'*Il4* dans les cellules T naïves est accompagnée par des modifications de chromatine permissives augmentant l'accessibilité du locus de l'*Il4*. Si les cellules sont différenciées en Th2, l'état du gène est stabilisé, alors qu'en condition Th1, une modification répressive des histones se met en place. Le locus de l'*Il4* est fortement méthylé (>90% de tous les CpG) dans les cellules T naïves⁶³. La méthylation est progressivement perdue lors de la différenciation en Th2. La déméthylation n'est pas essentielle à la transcription initiale de l'*Il4* mais semble nécessaire pour un haut niveau de transcription d'IL-4 dans les Th2⁶⁴.

Un autre niveau de régulation de l'expression de l'IL-4 intervient sur la sécrétion de celle-ci. La régulation de la sécrétion est dépendante de nombreux facteurs dont la zone d'action principale est le promoteur de l'*Il4*.

GATA-3 est le principal facteur de transcription régulant l'expression de l'IL-4. Il se fixe à la séquence consensus AGATAG présente à différents sites à proximité du gène de l'*Il4* dans la région intergénique *Il4/Il13* et en amont de la région codant l'*Il4*³⁴ (figure 11). L'expression de GATA-3 est faible dans les cellules T naïves et Th1 et très forte dans les cellules Th2⁵². *In vivo*, la souris déficiente en GATA-3, ne développe pas de réponse Th2 suite à l'infection par un parasite⁶⁵. Ceci mène à la conclusion que GATA-3 est essentiel pour l'induction de la différenciation Th2 et l'expression des cytokines associées. Il n'est cependant pas indispensable à son maintien⁵² qui est assuré par un autre facteur de transcription : c-maf. Celui-ci induit l'expression de l'IL-4 dans un environnement de chromatine établi sous l'influence de GATA-3⁵².

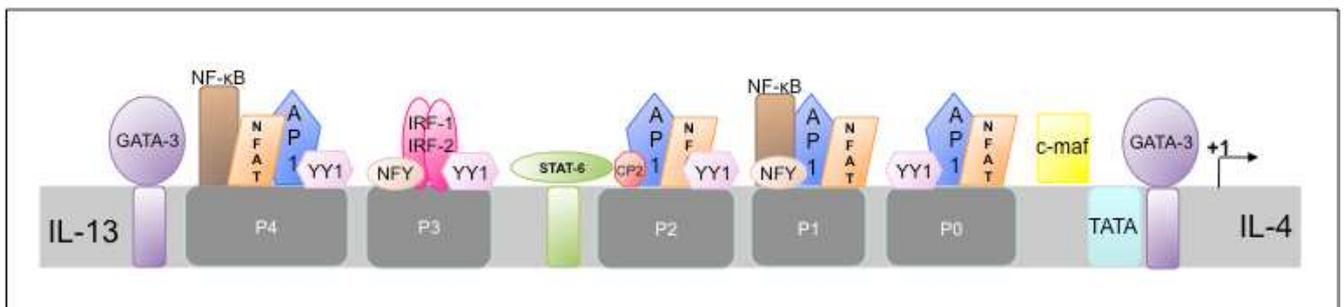


Figure 11 : sites de fixation des facteurs de régulation du gène de l'*Il4* en amont de celui-ci.

Le promoteur de l'IL-4 possède également 5 éléments (P0 à P4) sur lesquels peuvent se fixer le facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) (figure 11).

Dans la régulation induite par NFAT, intervient également la protéine AP-1. Ces facteurs ont été décrits comme possédant un rôle régulateur positif de l'expression de l'IL-4⁵². Dans les cellules en repos, NFAT est phosphorylé, il a donc peu d'affinité pour l'ADN. Lorsque les cellules T sont activées, NFAT est déphosphorylé dans le cytoplasme et peut donc subir une translocation dans le noyau afin de réguler l'expression de l'IL-4 par fixation sur l'ADN. NFAT est capable de se fixer seulement au promoteur de l'*IL4* dans les cellules Th2, et seulement au promoteur de l'*Ifng* dans les cellules Th1³⁶. Ainsi les protéines NFAT acquièrent une spécificité sélective à activer les gènes de l'*Ifng* et de l'*IL4* respectivement dans les cellules Th1 et Th2.

NF-κB (Nuclear Factor-kappa B) régule également de manière positive l'expression du gène de l'IL-4 en se fixant sur le site P1 du promoteur de l'IL-4⁶⁶. De nombreux autres facteurs jouent un rôle mineur dans l'expression de l'IL-4 comme le facteur régulateur de l'interferon 4 (IRF4), le facteur de transcription CP2, le facteur nucléaire Y (NFY) ou encore le facteur de transcription Ying Yang 1 (YY1)⁶⁶.

La transcription de l'IL-4 est par contre inhibée dans les cellules Th1. Cette répression se fait par la fixation du facteur T-bet⁵² qui agit par complexation avec les facteurs Runx3 et Hlx. IRF1 et IRF2, induits par l'IFN-γ, sont également des régulateurs de l'expression de l'IL-4 qui se fixent au promoteur de celle-ci.

Les cellules naïves et Th1 montrent la présence de facteurs inhibant l'expression de l'IL-4, tandis que dans les cellules Th2, les facteurs présents au niveau du promoteur ont un rôle favorable⁵².

Cinq sites d'hypersensibilité à la DNaseI, notés HS, ont été identifiés sur le gène de l'*IL4* au niveau des introns. Deux de ces sites, HSII et HSIII, se situent dans l'intron 2 et sont impliqués dans l'expression de l'IL-4 dans les cellules Th2 et les mastocytes³⁶. Les facteurs de transcription STAT ont été identifiés comme capables de se fixer à ces sites HS. CNS1 est une séquence non codante qui contient deux autres sites HS spécifiques du phénotype Th2. Cette séquence se situe entre les gènes de l'*IL4* et l'*IL3*. Il apparaît que l'acétylation des histones de la séquence CNS1 est corrélée avec une induction de l'expression du gène de l'*IL4*³⁶. Le dernier site HS est situé dans la région 3' du gène de l'*IL4* et constitue une région de fixation pour les protéines NFAT, STAT6 et GATA3³⁶.

4. Les variants d'épissage de l'interleukine-4

Un variant d'épissage du gène codant pour l'IL-4, caractérisé par une délétion de l'exon 2, a été identifié par séquençage chez le lapin en 2000⁶⁷. La nomenclature utilisée pour ce variant est IL-4 δ 2 pour la délétion de l'exon 2. Il a également été identifié par séquençage en 2002 chez les primates (chimpanzé et macaque cynomolgus) au sein de notre laboratoire¹¹¹. Mais ce n'est que plus tardivement, en 2005, que ce variant a été caractérisé chez la souris⁶⁸. D'autres variants de l'IL-4 ont également été découverts. L'IL-4 δ 3, avec une délétion de l'exon 3, est exprimé suite à la vaccination par le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) chez le bovin⁶⁹. Découvert en 2009, un nouvel ARNm appelé VIL-4 a été identifié chez le macaque suite à une infection à *Mycobacterium tuberculosis* ou le bacille de Calmette-Guérin^{70,71}. Ce variant possède une partie C terminale différente de l'IL-4. Dans les PBMC de patients atteints du VIH, un ARNm délété de 13 paires de bases a été identifié en conditions pro-apoptotiques⁷².

Toutefois, c'est chez l'humain que le premier variant d'épissage de l'IL-4 a été découvert. L'IL-4 δ 2 a été identifié pour la première fois en 1993 par RT-PCR (reverse transcription-Polymerase chain reaction) sur des ARN extraits de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell ou cellules périphériques mononuclées du sang)⁷³ (figure 12).

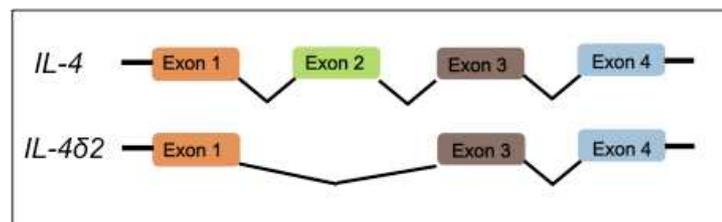


Figure 12 : ARNm de l'IL-4 composé de 4 exons et IL-4 δ 2 délété de l'exon 2.

Ce variant d'épissage a, depuis, été retrouvé dans différents types cellulaires : les lymphocytes T²⁷, les cellules issues de lavages bronchoalvéolaires⁷⁴, le thymus⁷⁴, les thymocytes⁴¹, et ceci par différentes méthodes : RT-PCR et RNase protection assay²⁷.

L'ARNm codant pour l'IL-4 δ 2 est exprimé dans les PBMC généralement en quantité inférieure à l'ARNm codant pour l'IL-4⁷⁴. Au contraire, l'ARNm de l'IL-4 δ 2 est exprimé plus fortement que celui de l'IL-4 dans les thymocytes et les lavages bronchoalvéolaires, suggérant

la spécificité de l'expression au niveau de ces tissus^{40,41,74}. L'expression relative de l'IL-4 et de l'IL-4 δ 2 est un facteur important à prendre en compte pour une bonne caractérisation de la réponse immunitaire. En effet, la quantité d'IL-4 δ 2 retrouvée dans les différents organes pourrait être dépendante de l'état physiologique du donneur.

i. La structure de l'IL-4 δ 2

La délétion de l'exon 2 donne une protéine tronquée de la partie correspondant aux acides aminés 22 à 37⁴¹ conduisant à la perte de la majeure partie de la boucle A-B et du feuillet β A reliant les hélices A et B⁴⁰. Une analyse en dichroïsme circulaire et en spectroscopie Infra-Rouge, montre que l'IL-4 possède 60% de structure en hélices alpha et que l'IL-4 δ 2, produite en levure, possède également 60% de structure en hélices alpha⁴¹. Ces analyses confirment la similitude de leur structure secondaire. L'IL-4 possède 3 ponts disulfures: Cys3-Cys127, Cys24-Cys65, Cys45-Cys99. Or la cystéine en position 24, impliquée dans la formation d'un pont disulfure est éliminée dans l'IL-4 δ 2⁴¹. Cependant, Vasiliev *et al.*⁴¹ ont montré que l'IL-4 δ 2 conserve deux ponts disulfures et une Cystéine libre selon le schéma suivant : Cys3-Cys45 et Cys 99-Cys 127. Cys 65 quand à elle reste libre⁴¹. Cette perte ne semble pas changer la structure de la protéine⁷⁴. Deux modèles s'opposent concernant la structure secondaire de l'IL-4 δ 2. En effet, Zav'Yalov *et al.*⁴⁰ proposent un modèle « down-up-down-down » dans lequel l'hélice A est retournée (l'IL-4 suit le modèle up-up-down-down), alors que Vasiliev *et al.*, indiquent une conservation de la structure up-up-down-down⁴¹. Un changement dans la structure de l'IL-4 δ 2 vis-à-vis de l'IL-4 peut induire un changement de fonctionnalité de cette protéine et une reconnaissance différente au niveau du récepteur spécifique.

Bien que son arrangement soit encore soumis à controverse, l'IL-4 δ 2 semble garder une structure secondaire très proche de celle de l'IL-4, étant ainsi capable d'interagir avec l'IL-4R α . Cependant, l'IL-4 δ 2 semble perdre sa capacité à fixer la chaîne γ c du récepteur de type I⁴¹. Ainsi l'IL-4 δ 2 pourrait agir comme un antagoniste de l'IL-4 en se fixant au récepteur mais en n'étant pas capable d'activer une voie de signalisation.

ii. Etude de la fonction de l'IL-4δ2

L'effet antagoniste de l'IL-4δ2 par fixation compétitive au récepteur à l'IL-4 a été démontré par un test de prolifération par incorporation de thymidine tritiée au cours duquel de l'IL-4δ2 recombinante a inhibé la prolifération des lymphocytes T induite par l'activation de l'IL-4^{41,75}. Ce premier test de fonctionnalité indique qu'une quantité d'IL-4δ2 de 20 à 200 fois supérieure à celle de l'IL-4 est nécessaire à cette inhibition⁷⁴. De plus, l'IL-4δ2 antagonise la capacité de l'IL-4 à induire la production des IgE par les lymphocytes B et l'expression du marqueur CD23²⁹, sur des lymphocytes B isolés de donneurs sains. Enfin, l'IL-4δ2 est capable de bloquer l'action inhibitrice de l'IL-4 sur l'expression de cyclooxygénase-2 par les monocytes stimulés au Lipopoly-saccharides (LPS)²⁹. Cette inhibition semble être dépendante de la glycosylation⁷⁴. En 1999, Atamas *et al.*⁷⁶ va plus loin dans la réflexion en suggérant que l'IL-4δ2 peut être considérée comme une cytokine Th1, car elle a des effets antagonistes à ceux d'une cytokine Th2. Toutefois, une étude a montré que l'IL-4δ2 a un effet agoniste à celui de l'IL-4 dans la production de collagène par les fibroblastes⁷⁷. En effet, dans cette étude, de l'IL-4 et de l'IL-4δ2 recombinantes ont induit *in vitro* la production de collagène par une lignée cellulaire de fibroblastes. Ainsi certains auteurs suggèrent que l'IL-4δ2 peut être un agoniste et un antagoniste de l'IL-4 en fonction de son affinité pour le récepteur sur différents types cellulaires⁷⁸. On peut cependant supposer que l'IL-4δ2 soit un antagoniste de l'IL-4 dans les cellules hématopoïétiques et un agoniste de l'IL-4 dans les cellules non hématopoïétiques.

De récentes études, réalisées chez la souris, montrent que les isoformes de l'IL-4 humaine sont fonctionnellement actives *in vivo* chez la souris. Une surexpression de l'IL-4 et l'IL-4δ2 humaines chez la souris provoque l'accumulation de lymphocytes ainsi que des cytokines dans le milieu. Cela induit également l'augmentation de cellules T régulatrices parmi les Thelper ainsi qu'une tendance à l'accumulation de collagène dans les poumons⁷⁹. Une étude publiée début 2012, a été menée sur des échantillons de personnes saines et des échantillons de patients asthmatiques⁸⁰, afin de déterminer la présence d'IL-4δ2 *in vivo* chez l'homme. Pour la première fois de l'IL-4δ2 sous forme protéique a été mesurée dans les lymphocytes T de patients asthmatiques stimulés par les activateurs Phorbol Myristate Acetate et ionomycine (PMA/iono). Cette détection a été réalisée avec un test ELISA dont l'anticorps de détection est spécifique à l'IL-4δ2. Cette étude est soumise à caution car les résultats présentés n'indiquent pas le protocole de production de l'anticorps spécifique ni la

validation de cet ELISA. Il s'avère cependant que l'IL-4 est sécrétée 12 à 24h après stimulation alors que l'IL-4 δ 2 n'apparaît que 48h après stimulation. De plus, les cellules Th1, Th2 et Th17 ne semblent pas être les principales cellules productrices d'IL-4 δ 2⁸⁰. Une autre sous population de cellules T doit prendre en charge cette production.

De nombreuses questions restent en suspens quant à la fonctionnalité de ce variant.

L'épissage alternatif s'applique à la plupart des transcrits et notamment à ceux des cytokines. Ainsi, plusieurs messagers sont issus du même gène. Pour l'étude de la réponse immunitaire, il est très important de prendre en compte ces messagers qui peuvent donner naissance à des molécules ayant un effet antagoniste à celui du variant ciblé.

5. Les maladies associées à l'IL-4

L'IL-4 est connue pour permettre une défense immunitaire contre les infections parasitaires^{31,32} en induisant la production d'IgE par les lymphocytes B. Le niveau d'IL-4 a été retrouvé comme significativement augmenté chez les patients souffrant de la tuberculose⁸¹ ou encore de sclérodermie⁸². Cependant des dérives sont régulièrement mise en exergue car une surexpression de l'IL-4 est, quant à elle, associée aux allergies²⁴ et à l'asthme⁶⁰. Le rôle de l'IL-4 dans la défense contre les bactéries reste ambigu. Toutefois, une étude a montré que l'IL-4 joue un rôle dans l'élimination de *Pseudomonas aeruginosa* des poumons *in vivo* chez la souris dans laquelle l'IL-4 participe à l'induction d'une réponse inflammatoire, nécessaire à l'élimination bactérienne⁸³.

Dans le cas de l'allergie, la quantité d'IL-4 retrouvée dans le sérum et les lavages bronchoalvéolaires de personnes allergiques est plus élevée que chez les personnes saines²⁴. Cependant, l'IL-13 peut également induire les effets de l'allergie comme l'inflammation des poumons comme l'hypersécrétion de mucus ou encore l'hyper-réponse des voies respiratoires (AHR ou airway hyper-responsiveness)²³. Le niveau de deux cytokines IL-4 et IL-13 est donc à prendre en compte dans les allergies. Il semble également important de tenir compte de l'IL-4 δ 2, car une variation de l'expression relative des variants de l'IL-4 est, en effet, un facteur important dans les maladies telles que l'asthme et la tuberculose^{71,78}.

L'IL-4 semble être une cible de choix pour l'élaboration de thérapies dans de nombreuses maladies. Cependant, cette voie est limitée pour deux raisons. Premièrement,

l'activité de l'IL-4 semble être dépendante de l'espèce considérée ce qui limite l'utilisation de modèles animaux dans l'étude de la réponse aux médicaments testés. Deuxièmement, cette cytokine existe sous 2 isoformes, l'IL-4 et l'IL-4 δ 2 et peu d'informations sur les fonctions de cette dernière sont disponibles⁸⁰.

i. Le cas de l'asthme

1. L'asthme, une maladie inflammatoire pulmonaire

L'asthme est considéré comme un trouble inflammatoire chronique de la muqueuse pulmonaire. Les patients souffrant d'asthme sont génétiquement prédisposés à générer des anti-IgE lors d'exposition aux allergènes environnementaux²³. Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans l'inflammation des poumons : les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes T CD4+. Une fois ces cellules activées, elles sécrètent de nombreuses cytokines et médiateurs inflammatoires. L'inflammation se caractérise par des pertes vasculaires, des contractions du muscle lisse des bronches, de l'hypersécrétion de mucus, une hyperplasie des cellules à gobelet, et une remodelisation des poumons^{22,84}. Dans le cas de l'asthme, l'IL-4 joue un rôle pro-inflammatoire important, notamment par la différenciation des lymphocytes Th2, l'induction de la production d'IgE, l'augmentation de l'expression des récepteurs à l'IgE, la transmigration des éosinophiles dans les poumons, l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes T ou encore l'hypersécrétion de mucus²⁴. Le taux élevé d'IgE est orchestré par les CD4+ Th2²³ qui induisent une hyper-sensibilité et maintiennent l'état d'inflammation chronique. Cet état inflammatoire résulte non seulement de l'IL-4 mais aussi de la présence d'autres cytokines et de facteurs de croissance sécrétés par les cellules inflammatoires mais aussi par les cellules épithéliales, les fibroblastes, ou encore cellules musculaires lisses⁸⁵. L'IL-4 et l'IL-13 semblent cependant être les cytokines les plus impliquées dans la réponse allergique. L'IL-4 et l'IL-13 se fixent au récepteur de type II, sur les cellules du muscle lisse et les cellules épithéliales, et induisent l'AHR et la sécrétion du mucus respectivement. Chez les patients asthmatiques, le taux d'IL-4 en tant qu'ARNm ainsi qu'en tant que protéine est plus élevé que chez les personnes non asthmatiques⁸⁵.

Le polymorphisme de l'IL-4 et de son récepteur l'IL-4R est impliqué dans la sévérité de la maladie^{24,85,86}. En particulier, les variants 33C>TIL-4 et 576Q>RIL4 ont été plus fréquemment observés chez les patients souffrants d'asthme sévère⁸⁶. Le variant d'épissage de l'IL-4, l'IL-4 δ 2 est également impliqué dans la pathologie asthmatique. En effet, plusieurs études ont montrées que le cas de l'asthme, l'IL-4 est exprimé environ 500 fois plus que

l'IL-4 δ 2 dans le sang périphérique^{78,87} ainsi que dans les mastocytes⁸⁸. Cependant d'autres études contredisent ces résultats quant à la quantification d'IL4 δ 2 chez des personnes asthmatiques. En effet, la quantité d'IL-4 δ 2 retrouvée chez les asthmatiques a été montrée comme non variable⁷⁸ dans une étude et augmentée vis à vis des personnes saines⁸⁹ dans une autre étude. Ces différences peuvent venir des méthodes de détection (qPCR ou nested PCR), qui, si elles ne sont pas discriminantes des 2 variants, peuvent amener des biais dans la mesure. L'atopie (prédisposition à développer une réponse IgE suite à l'exposition à des allergènes environnementaux³⁷) et la présence d'autres cas familiaux sont des facteurs prédisposant au développement de l'asthme.

Une étude récente a montré que dans le cas de l'asthme, l'IL-4 est produite 24h-48h après activation cellulaire tandis que l'IL-4 δ 2 est produite 72h après. Il semblerait que l'IL-4 δ 2 prenne la suite de l'IL-4 peut-être en temps que régulateur⁸⁰. De plus, l'IL-4 δ 2 a été retrouvée sous forme protéique chez des sujets asthmatiques mais pas chez des personnes saines⁸⁰.

Un niveau disproportionné d'IL-4 δ 2 vis-à-vis de l'IL-4 peut contribuer à certaines maladies. Un trouble de l'expression relative des variants de l'IL-4 est, en effet, un facteur important dans des maladies telles que l'asthme ou la tuberculose^{71,78,80}.

2. Les traitements en cours de développement

Cette maladie nécessite un traitement anti-inflammatoire sur du long terme. Le corticostéroïde inhalé (ICS) est le traitement le plus efficace utilisé pour l'asthme persistant. La fixation de ces corticostéroïdes aux récepteurs cytoplasmiques permet la répression de l'expression des gènes inflammatoires⁸⁴. Les patients ressentent donc une amélioration clinique grâce à une réduction de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire et une réduction de l'expression de nombreuses cytokines dont l'IL-4³⁷. Chez beaucoup de patients, l'ICS est complété avec un « long-acting β_2 -agoniste » ou LABA, ce qui rend la thérapie plus efficace⁸⁴. Cependant tous les patients traités par ICS ne voient pas leur asthme amélioré, même en augmentant les doses du traitement ou en le combinant avec d'autres agents⁸⁴.

Une des approches de la recherche pour un traitement de l'asthme s'intéresse aux cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IL-4 et le TNF α) ou encore aux cellules inflammatoires (Th2 et eosinophiles)⁸⁴. Différents antagonistes de l'IL-4 ont été étudiés ou sont à l'étude pour traiter l'asthme. On retrouve le récepteur à l'IL-4 recombinant humain

soluble (IL-4Rs), l'IL-4 mutein, l'anticorps monoclonal anti-IL-4 humanisé et l'anti IL-4R monoclonal²⁴.

- L'IL-4R soluble est considéré comme un antagoniste de l'IL-4 ainsi le blocage de l'IL-4 de cette manière est un mécanisme anti-inflammatoire neutralisant les effets de l'IL-4. La société Immunex Corporation a développé Nuvance, un récepteur soluble recombinant, produit dans un système d'expression de type mammifère²⁴. Ces essais n'ont pas donné d'effets assez probants pour que l'étude puisse être continuée.
- L'IL-4 mutein, un antagoniste du récepteur à l'IL-4, est un double mutant de l'IL-4 (Arg121 et Tyr124 mutés en acide aspartique) exprimé en *E.coli* (Bayer Pharmaceutical Corporation). Cette protéine a conservé une forte affinité pour le récepteur IL-4R α sans induire de signal et a été bien toléré en étude clinique. Cependant le projet a été abandonné au vu de la courte demi-vie du produit (6h) et de l'impossibilité d'en faire un produit non injectable.
- Un Anti-IL-4 monoclonal IgG1 humanisé a été développé par GlaxoSmithKline pour le traitement de l'asthme. Celui-ci permet de neutraliser l'IL-4 produite en trop forte quantité dans cette pathologie. Le produit est sain et bien toléré par l'organisme lors des phases clinique, cependant, il a été jugé trop peu efficace pour continuer le développement du produit.
- Un anti-IL-4R monoclonal est en cours de développement (Amgen corporation). Celui-ci est dirigé contre l'IL-4R α inhibant ainsi la fixation de l'IL-4 et de l'IL-13.

Pour l'instant aucun essai de traitement contre l'asthme visant l'IL-4 et/ou son récepteur n'a montré de réelles efficacités²⁴. En effet, de nombreux facteurs interviennent dans cette pathologie et on peut penser que la présence de l'IL-4 δ 2 dont le rôle dans cette pathologie n'est pas déterminé puisse influencer les thérapies visant l'IL-4 ou son récepteur.

ii. L'IL-4 et le VIH

Sur des personnes porteuses du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'IL-4 est fortement exprimée dans le sang périphérique⁷². Beaucoup d'études ont montré l'implication de l'IL-4 dans l'infection par ce virus mais les informations sont contradictoires. En effet, certaines annoncent que la réponse Th2, induite par l'IL-4, facilite la progression de

la maladie vers le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)^{90,91} tandis que d'autres restent sceptiques⁹².

L'IL-4 semble avoir un effet variable sur l'infection par le VIH-1. En fait, l'IL-4 stimule la production du virus VIH-1 dans les monocytes et macrophages dérivé de sang humain lorsqu'elle est ajoutée après de l'infection des cellules par le virus⁹³, mais l'IL-4 peut aussi inhiber de 60% la réplication du virus lorsqu'elle est ajoutée avant l'infection des cellules épithéliales colorectales HT29⁹⁴. Ces résultats peuvent être expliqués également par la présence d'un variant d'épissage de l'IL-4, l'IL-4 δ 2. Ce variant peut induire un biais lors de la mesure des cytokines s'il n'est pas pris en compte⁹⁵. Une étude indique en particulier que dans le cas d'une co-infection VIH-1 et *M. Tuberculosis*, les quantités relatives d'IL-4 et d'IL-4 δ 2 sont modifiées. L'IL-4 est surexprimée (tout comme l'IFN- γ) dans les poumons et dans le sang tandis que l'IL-4 δ 2 est surexprimée seulement dans les poumons⁹⁵. Avec un traitement anti-tuberculose, le niveau d'IL-4 δ 2 augmente tandis qu'aucun changement n'est détecté dans le niveau d'IL-4⁹⁵. Une autre étude a montré qu'un ARNm alternatif de l'IL-4, l'IL-4 δ 13, une molécule non sécrétée, est induite pendant l'apoptose (détectée par un anticorps 8D4)⁷². Ce variant délété de 13 paires de bases a été détecté en forte quantité dans les cellules mononuclées du sang périphérique des personnes infectées par le VIH-1⁷². Ces deux exemples illustrent l'importance de des variants d'épissage de l'IL-4 lors des études sur l'infection par VIH-1.

iii. L'implication de l'IL-4 dans la tuberculose

La tuberculose touche 10 millions de personnes chaque année et tue plus de 2 millions de personnes par an. Le vaccin Bacille Calmette-Guerin (BCG) n'est malheureusement efficace qu'un nombre limité d'années, n'empêchant pas la transmission de la bactérie, notamment dans les pays en voie de développement, les plus touchés par la maladie. Cependant, le traitement de la tuberculose est peu onéreux et très efficace. Toutes les personnes infectées ne développent pas la maladie et sont donc considérées latentes, car porteurs sains⁸¹. L'IFN- γ joue un rôle important dans la protection contre *M. tuberculosis*. Cependant lui seul ne peut permettre le contrôle de la bactérie. Ce contrôle passe par une réponse Th1 élevée (IFN- γ , IL-12) ainsi que par une inhibition de la réponse Th2 (IL-4 notamment)⁸¹.

Dans les pays en voie de développement, la forte exposition aux helminthes et mycobactéries environnementales engendre un fort taux de cytokines Th2⁹⁶. L'activité Th2 présente chez ces personnes oriente une infection par *M. tuberculosis* vers une évolution de la maladie contrairement à une réponse Th1 qui oriente l'infection vers une latence⁹⁶.

a) Les profils de cytokines pour les différentes phases d'infection

Des études ont montré que l'IL-4 augmente chez les personnes malades. Sur un test *in vitro*, un antigène de *M. tuberculosis* induit une augmentation d'ARNm codant pour l'IL-4 mais pas pour l'IL-4 δ 2⁹⁵. Le taux d'ARNm codant pour l'IL-4 est augmenté dans la tuberculose pulmonaire humaine⁹⁷. Cette augmentation serait même en corrélation avec la sévérité de la maladie⁸⁷. Cependant, cette étude se base sur des échantillons issus de Gambie, un pays à risque vis-à-vis des infections aux helminthes. Dans des échantillons du Danemark, le taux d'IL-4 chez les patients atteints de tuberculose est sensiblement identique aux donneurs sains⁸¹.

Une étude effectuée à Londres avec des patients d'ethnicité différente montre que le ratio IL-4/IFN- γ est supérieur chez les personnes malades que chez les contrôles. De plus la demi-vie des ARNm codant pour l'IL-4 est supérieure chez les personnes malades par rapport aux contrôles, alors que pour l'IL-4 δ 2, la demi-vie reste inchangée entre les personnes malades et les personnes saines⁴². Il en découle que l'ARNm codant pour l'IL-4 est plus stable chez les personnes atteintes de tuberculose que chez les personnes saines.

Pour une tuberculose latente, le taux d'ARNm codant l'IL-4 δ 2 dans le sang périphérique est très élevé^{42,87,96,97} tandis que le taux d'IL-4 reste identique à celui d'une personne saine^{87,95}.

Chez le bovin atteint de tuberculose bovine, deux variants de l'IL-4 sont produits : l'IL-4 δ 2 et l'IL-4 δ 3. Suite à la vaccination avec le BCG, le taux d'IL-4 δ 3 augmente. Ce qui permet d'établir un lien entre l'IL-4 δ 3 et la protection du bovin naturellement exposé à la souche bovine de la tuberculose⁶⁹.

Que ce soit chez les bovins ou chez l'humain, la différence de profil d'expression des variants d'épissage de l'IL-4 entre un état sain et un état infecté permet de s'interroger sur l'implication des variants dans l'état pathologique. En effet, chez l'homme la présence d'IL-4 δ 2 est associée à une latence. Dans le cas de traitement ou de vaccination, il semble donc important d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th1.

b) *Le traitement contre la tuberculose*

Pendant le traitement contre la maladie le taux d'ARN codant l'IL-4 δ 2 augmente^{42,95}. En ce qui concerne l'IL-4, celui-ci diminue^{42,96} ou reste constant selon les études⁹⁵. Djoba Siawaya *et al.*⁹⁸ ont montré qu'une semaine après le début de la thérapie, le taux d'IL-4 est diminué de 4 fois tandis que le taux d'IL-4 δ 2 est augmenté 32 fois. Dans le cadre de cette étude, les personnes répondant rapidement au traitement (fast responder) ont un taux d'IL-4 δ 2 19 fois supérieur au bout d'une semaine, et un taux d'IL-4 peu variable. Pour les personnes répondant plus longuement (slow responder), le taux d'IL-4 δ 2 est augmenté 47 fois en une semaine et le taux d'IL-4 diminue.

Cet exemple nous montre que la prise en compte de l'IL-4 δ 2 est indispensable dans l'étude de la tuberculose.

L'IL-4 est une cytokine pleïotropique du système immunitaire qui joue un rôle dans de nombreuses maladies dont certaines sont citées ici. Cependant, l'étude de l'implication de l'IL-4 dans un contexte pathologique ne peut faire abstraction de l'étude de son principal variant d'épissage : l'IL-4 δ 2.

Lors des travaux effectués sur l'étude de l'IL-4 δ 2, de nouveaux variants d'épissage de l'IL-4 ont été séquencés. Ces découvertes nous ont mené à nous intéresser aux mécanismes d'épissage et de régulation de ceux-ci.

L'EPISSAGE DES ARN messagers

I- L'épissage

En 1977, Roberts et Sharp ont identifié le processus d'épissage, ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 1993. La même année, la dénomination des introns (parties non codantes) et des exons (parties codantes) composant un gène a été déterminée par Walter Gilbert⁹⁹. L'épissage est caractérisé par un mécanisme au cours duquel les introns (pouvant atteindre des centaines de kilobases) sont éliminés et les exons (d'une taille moyenne de 137 nucléotides) sont joints les uns avec les autres¹⁰⁰. L'épissage est un phénomène désormais connu chez toutes les espèces eucaryotes.

Le gène, préalablement transcrit en ARN pré-messager composé des introns et des exons du gène, subit le phénomène d'épissage. Le transcrit nouvellement produit est sujet à un processus de maturation dans le noyau¹⁰¹ (figure 13). Une coiffe (cap) est ajoutée en 5' au moment de la transcription. Sur cette coiffe se fixe une protéine appelée cap-binding protein (CBP) composée de deux sous-unités : CBP80 et CBP20¹⁰². Cet hétérodimère est conservé après le premier passage de traduction. Puis, ces protéines sont progressivement remplacées par le facteur d'initiation de traduction, l'eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E), sur la coiffe lors de passages successifs de ribosomes pour la traduction de l'ARNm. En 3', sur la queue poly(A) se fixe la protéine poly(A)-binding N1 (PABPN1). Cette protéine est remplacée par PABPC1 à l'arrivée de l'ARNm dans le cytoplasme¹⁰². Chez les mammifères la transcription et la maturation se font de manière coordonnée. L'ARN messager qui a reçu sa coiffe, sa queue poly(A) et qui a subi l'épissage est désormais mature et peut être exporté du noyau vers le cytoplasme pour être traduit en protéine.

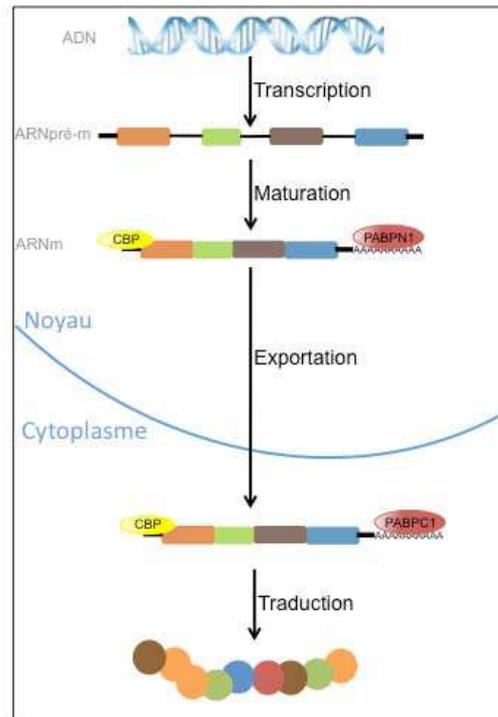


Figure 13: Transcription et traduction d'un gène dans une cellule eucaryote. Le gène est transcrit en ARN pré-messager qui subit ensuite le phénomène d'épissage. Après l'ajout d'une coiffe et d'une queue polyA, l'ARNm est exporté dans le cytoplasme pour être traduit en protéine.

L'épissage est un phénomène bien décrit et hautement régulé. Un complexe polyprotéique, le spliceosome, induit l'excision des introns et la ligation des exons les uns avec les autres donnant un ARN messager codant.

Il est admis que l'épissage n'a lieu que si des séquences consensus sont présentes sur les exons et introns de l'ARN pré-messager. Ces séquences ou cis-éléments sont des sites cibles pour la fixation de protéines nécessaires à l'épissage^{101,103}. Elles ont été identifiées très rapidement après la découverte des exons et introns. Dans les années 80, des séquences consensus sont proposées pour le site donneur, le site accepteur et la région riche en pyrimidines, après comparaison de nombreux gènes humains et viraux^{104,105}. Le site donneur 5' correspond à la séquence consensus située à la jonction entre un exon et l'intron à épisser. Cette séquence consensus est AG/GURAGU avec AG présent dans l'exon et GU dans l'intron. Le site donneur va interagir avec un site accepteur 3' AG qui se trouve à la fin de l'intron à épisser. Il est précédé par une pyrimidine (Y = Uracile ou Cytosine). Ces 2 sites situés aux jonctions de l'intron à éliminer ne sont pas suffisants pour qu'il y ait épissage. Ainsi, en 1984, Padgett *et al.*¹⁰⁶ indiquent la présence d'un point de branchement en amont du site 3' et nécessaire à l'épissage. Ce site, situé entre 18 et 40 nucléotides en amont du site

accepteur, est caractérisé par la séquence consensus YNYURAY avec l'adénine en tant que point clef de cette séquence (avec N=A, T, G ou C, Y=T ou C et R=G ou A) (Figure 14). Une région riche en pyrimidines (C ou T), constituée de plus de 10 pyrimidines, se trouve entre le point de branchement et le site accepteur 3'.

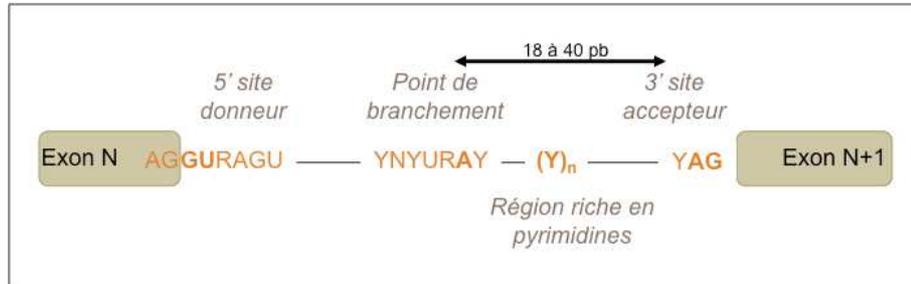


Figure 14 : Séquences consensus nécessaires à l'épissage d'un ARN pré-messager

1. Le mécanisme d'épissage

L'épissage des ARN pré-messager se fait par action du spliceosome dans le noyau de la cellule¹⁰⁷. Ce mécanisme implique deux trans-estérifications successives de type SN2 (réaction en une étape sans création d'intermédiaire réactionnel) (figure 15)^{101,107}.

La première trans-estérification se fait par action du 2'-hydroxyl de l'adénine du point de branchement sur la liaison phosphodiester du site donneur 5'. Ceci induit la cyclisation de l'intron formant une structure en lasso. Le 3'-hydroxyl du site donneur 5' agit ensuite sur la liaison phosphodiester du site accepteur 3' induisant la libération du lasso. Les deux exons sont ainsi réunis et l'intron éliminé.

Le spliceosome est un complexe qui réalise l'épissage des ARN pré-messagers dans le noyau. Il s'agit d'une machinerie moléculaire dynamique composée de différentes sous unités avec lesquelles les ARNm et les protéines coopèrent étroitement. Ainsi, 5 small nuclear RiboNucleoprotein Particules (snRNPs) nommées U1, U2, U4, U5 et U6 ont été découvertes par Lerner et Steitz¹⁰⁸ en 1979 par analyse fingerprint et sont composées de protéines et d'une sous-unité appelée small nuclear ribonucleic acid (snRNA). Un grand nombre de protéines auxiliaires (>100)^{103,109} interviennent également dans l'épissage.

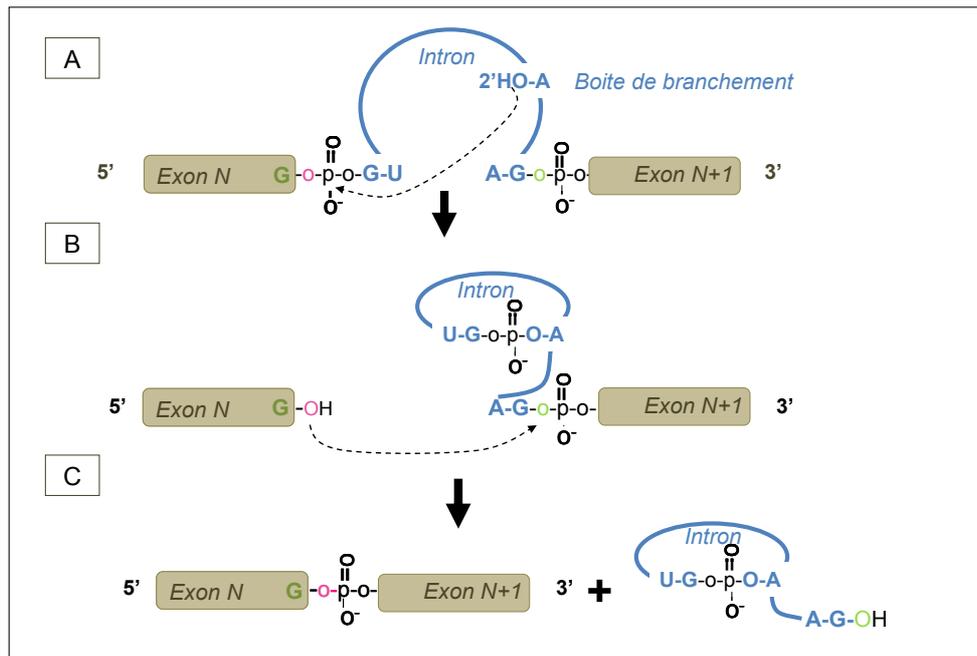


Figure 15 : Réaction de double trans-estérification lors de l'épissage. A : Première trans-estérification entre le OH en 2' de l'Adénine du point de branchement et le phosphate liant les deux guanines dans le site donneur d'épissage 5'. B : Deuxième trans-estérification entre le OH formé à la fin de l'exon N et le phosphate liant les deux guanines dans le site accepteur d'épissage 3'. C : Produits formés à la fin des 2 trans-estérifications, les 2 exons sont réunis et l'intron est éliminé.

Les différentes étapes de l'épissage sont bien décrites dans la littérature (figure 16). Les étapes d'assemblage et la nature des différents complexes ont été déterminées par des études *in vitro*. L'incubation d'ARNpre-messagers synthétiques marqués avec des extraits de levure ou des extraits eucaryotes, en présence d'Adénosine TriPhosphate (ATP), permet la production des intermédiaires réactionnels. Ces intermédiaires sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel natif. Le mécanisme d'épissage a donc été déterminé à partir des complexes intermédiaires de réaction. Ainsi, le snRNP U1 est le premier facteur à entrer en jeu. Il se lie au « site donneur 5' » par l'intermédiaire de son snRNA en s'appariant à la séquence donneur 5'. Cette première interaction est indépendante de l'ATP. Parallèlement, le facteur d'épissage 1 (SF1, pour splicing factor 1) s'accroche au point de branchement, formant le complexe $E^{101,107,109}$. Un second complexe appelé $E^{101,103,107,109}$ est créé à la suite de l'ajout du facteur auxiliaire U2 (U2AF) un hétérodimère, composé de deux sous-unités, découvert en 1989 par Grenn et Zamore¹¹⁰. La sous unité U2AF65 se fixe sur la région riche en pyrimidines et au point de branchement tandis que la sous unité U2AF35 se fixe au site

accepteur 3' AG. Le remplacement de SF1 par le snRNP U2 au point de branchement donne le complexe A encore appelé pré-spliceosome A¹⁰⁹. Cette réaction se fait de manière ATP-dépendante¹⁰¹. Ensuite, le recrutement des snRNP U4, U5 et U6 permet la formation du complexe B. Les snRNPs U4 et U6, s'assemblent en un complexe contenant 2 snRNAs¹⁰¹. L'association avec U5 crée un tri-snRNP pré-assemblé. Des changements conformationnels et des remaniements tels que la perte des sous unités U1 et U4 permet l'obtention du complexe C qui se trouve être le spliceosome actif^{101,109}. Ce spliceosome actif, isolé en 2008 par Bessonov¹¹¹ induit les 2 transestérifications successives. Ainsi les 2 exons sont joints et la partie intronique, sous forme de lasso, est éliminée. Les snRNP sont ensuite recyclées afin d'être utilisées pour un autre épissage.

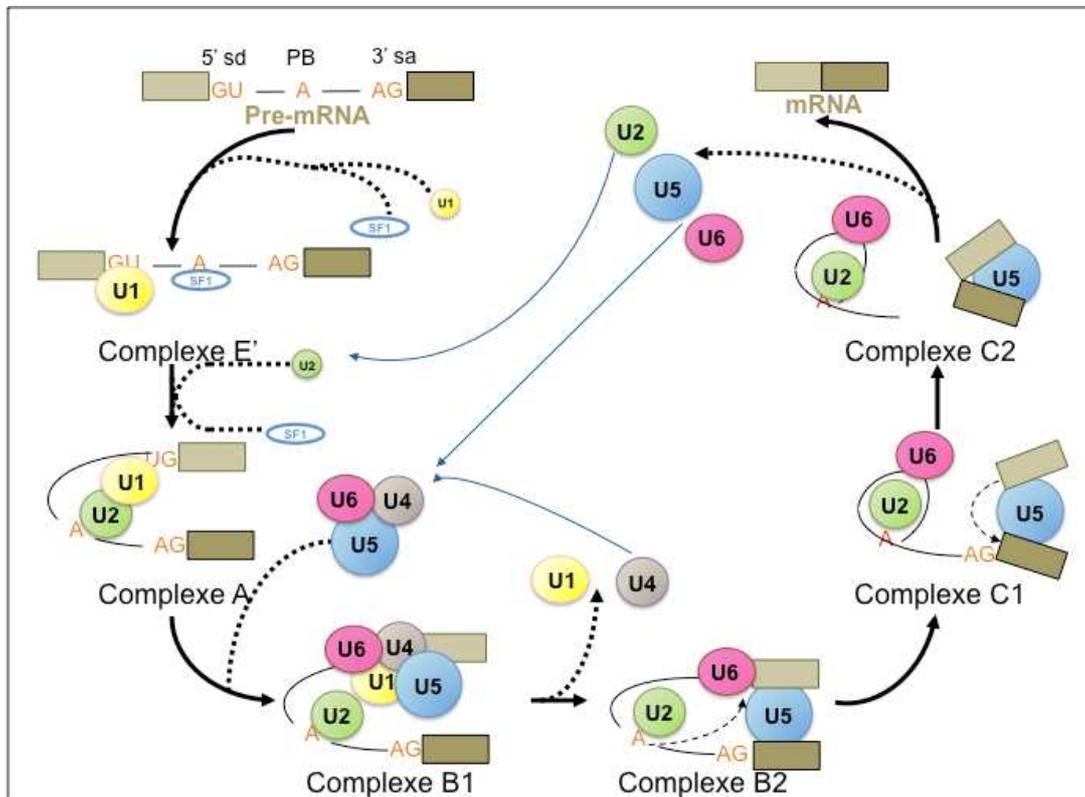


Figure 16 : Mécanisme réactionnel d'assemblage du spliceosome et de l'excision d'un intron.

Durant l'épissage, les introns sont excisés et les jonctions exon/exon sont fixées par un complexe multiprotéique nommé Exon Junction Complex (EJC). Cet EJC est composé de plus de 10 protéines, notamment UPF2 et UPF3 impliquées dans le NMD (Nonsense-Mediated Decay). Ce complexe se situe 20 à 24 nucléotides en amont de la jonction exon/exon et ces nombreuses protéines interagissant soit avec l'ARN messager directement soit avec des intermédiaires d'épissage¹¹². Les ARN messagers nouvellement exportés du noyau et

comportant le cap-binding complex (CBC) en 5' terminal de l'ARNm sont sujets à la traduction. L'information positionnelle donnée par l'EJC est conservée pendant l'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme et ce jusqu'à ce que l'ARNm soit traduit.

Le spliceosome, complexe hautement actif¹¹³, catalyse le clivage de l'ARN messenger et la ligation des différents exons avec une très forte fidélité. Cependant le mécanisme de catalyse de ce complexe et le site actif de celui-ci sont assez peu décrits. Par homologie avec le fonctionnement du ribosome, les ARN des snRNP pourraient avoir ce rôle catalytique¹¹³. La génération de la structure haute résolution du spliceosome permettrait de déterminer la conformation exacte des différents complexes et notamment du site actif. Ceci pourrait permettre de résoudre les différentes inconnues restantes sur le fonctionnement du spliceosome.

Les nombreuses études portant sur l'épissage montrent que ces séquences consensus d'épissage sont très conservées¹¹⁴ (figure 17). Cependant, un spliceosome alternatif a été décrit dans le milieu des années 90 par Patel *et al.* Celui-ci reconnaît une classe rare d'introns possédant des séquences consensus alternatives (figure 17). Ce spliceosome alternatif est composé des protéines U11 et U12¹¹⁵, protéines absentes du spliceosome majoritaire. L'utilisation de U5 semble être conservée par ce spliceosome contrairement aux autres snRNP (U1, U2, U4 et U6) du spliceosome majoritaire.

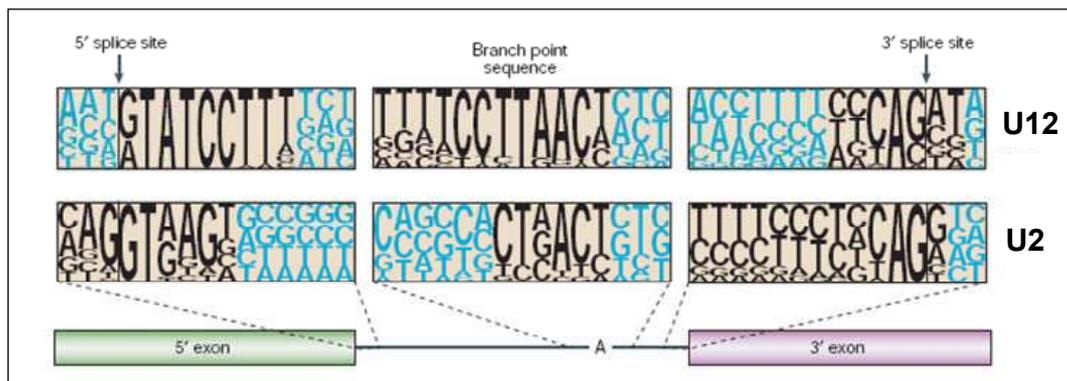


Figure 17 : Séquences consensus nécessaires à l'épissage classique noté U2 ou alternatif noté U12 d'un ARN pré-messager. Source : Patel *et al.*¹¹⁵

La présence de ce spliceosome alternatif confère à la machinerie d'épissage un large spectre d'utilisation. Celui-ci est conservé à travers l'évolution des espèces suggérant une origine ancienne et une importance critique. Les deux spliceosomes sont très similaires et

fonctionnent sur le même principe, ainsi, une origine commune est possible. Cependant, des recherches sont toujours en cours pour déterminer les mécanismes de régulation de l'utilisation de ce spliceosome alternatif.

Alors que longtemps l'épissage a été considéré comme une règle absolue, la découverte de ce spliceosome alternatif a permis de faire évoluer les connaissances et les recherches sur la génération de la diversité de l'information génétique.

2. L'épissage alternatif

Le séquençage du génome humain a permis de déterminer un nombre de gènes d'environ 22 000. Pendant longtemps, on pensait que le degré de complexité d'un organisme dépendait du nombre de gènes de celui-ci. Or de nombreuses espèces possèdent des génomes plus grands que celui de l'homme. Un exemple flagrant est le génome du riz (*Oryza sativa*) composé de plus de 53 000 gènes¹¹⁶. On conclue aisément que la complexité ne s'explique pas uniquement par le nombre de gènes de l'organisme en question. Toutefois, le protéome humain est composé de plus de 500 000 protéines ce qui ne correspond pas au nombre de gènes dénombrés. Ainsi un gène peut produire différentes isoformes protéiques et ceci est expliqué par le phénomène de l'épissage alternatif.

Découvert au début des années 80^{117,118}, l'épissage alternatif correspond à l'inclusion sélective de certains exons¹⁰³. L'épissage alternatif résulte d'une compétition entre les différents sites d'épissages¹⁰⁷. Différentes combinaisons ordonnées d'exons sont donc possibles à partir d'un même ARN pré-messager (figure 18). Ainsi un exon alternatif peut être délété, un intron ou partie d'intron peuvent être insérés et des sites d'épissage 3' ou 5' peuvent être utilisés.

Le choix de l'inclusion ou non d'un exon dépend de différents facteurs. La taille de l'exon est importante. En effet, les exons de petite taille sont moins souvent retenus dans l'ARNm car une gêne stérique des facteurs d'épissage empêche un fonctionnement correct du spliceosome¹⁰⁷. De plus, une force d'épissage est attribuée aux différents sites en fonction de la séquence des sites d'épissage. Les sites d'épissage faibles, c'est-à-dire ceux pour lesquels la séquence est assez éloignée de la séquence consensus, diminuent l'affinité du spliceosome, et ne favorisent pas l'utilisation de ces sites d'épissage¹¹⁹.

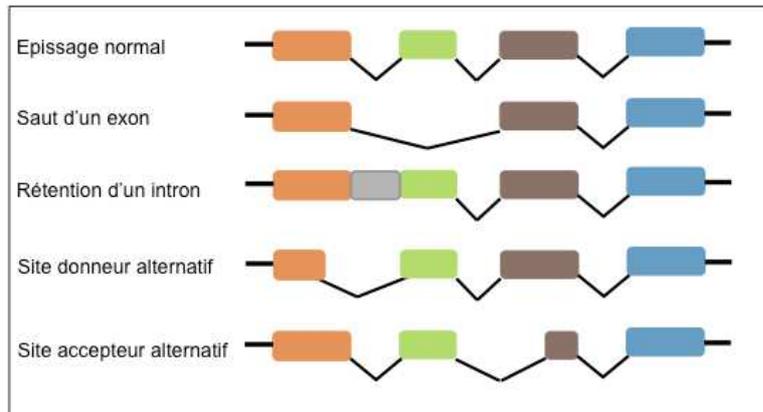


Figure 18 : Différentes configurations d'épissages alternatifs par saut d'un exon, rétention d'un intron ou partie d'intron, par la présence d'un site d'épissage donneur alternatif ou un site accepteur alternatif.

Lorsqu'une mutation a lieu au niveau d'un site d'épissage, un site cryptique peut être utilisé. Il s'agit d'un site situé en amont ou en aval du site muté, capable d'intervenir dans le processus d'épissage lorsque le site natif n'est plus valide¹²⁰. Ce type d'épissage peut induire une protéine différente potentiellement responsable de pathologies.

L'épissage alternatif peut se produire à différentes étapes du processus d'épissage : lors de la reconnaissance des sites d'épissage, lors du début de l'assemblage du spliceosome ou encore pendant les changements conformationnels entre les 2 étapes de trans-estérification¹⁰⁹. L'événement semble être dépendant de l'ARN et des facteurs de régulation de l'épissage liés à cet ARN.

Diverses conséquences résultent d'un épissage alternatif. L'utilisation de cadres de lecture différents (Open Reading Frame – ORF) peut mener à des protéines partiellement ou totalement distinctes. Si un site d'initiation AUG se situe sur l'exon alternatif, alors un second site d'initiation de la traduction peut être utilisé pour ce variant. Par le saut d'un exon ou l'ajout d'un exon alternatif, un codon stop peut prématurément terminer la synthèse de la protéine voire mener à un processus de Nonsense-Mediated Decay qui sera abordé dans la suite du manuscrit. L'épissage alternatif peut également induire la présence de plusieurs sites de polyadénylation. Le processus d'épissage alternatif nécessite un mécanisme de régulation important de la part des cellules pour éviter toute dérivation et pathologie liées à la production de protéines potentiellement toxiques pour la cellule.

A sa découverte, il était concevable que l'épissage alternatif soit un phénomène rare. Il a depuis été trouvé dans de nombreuses espèces comme les plantes, les animaux, les champignons ou encore *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila Melanogaster*. A l'heure actuelle, on estime que chez l'homme, 95% des gènes multi-exons subissent un épissage alternatif^{109,119} et 70 à 80% des épissages alternatifs induisent un changement de la protéine produite¹²¹. Chaque gène peut coder un nombre de protéines allant de 2 à quelques milliers¹²². De nombreux exemples d'épissage alternatif sont désormais connus. Un exemple significatif concerne le gène *Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam)* de la *Drosophila Melanogaster* pour lequel le gène possédant 24 exons peut être épissés en potentiellement 38 016 variants¹²³. On peut alors se poser la question de l'utilité d'un tel réservoir génétique.

On estime désormais que l'épissage alternatif des ARN pré-messager permet de réguler l'expression des gènes, de contrôler la diversification fonctionnelle des protéines ainsi que de moduler la réponse cellulaire^{107,109}. L'épissage alternatif est régulé suivant le type de tissus, en effet, plus de 50% des isoformes issues d'un épissage alternatif sont exprimées différemment dans les tissus¹⁰⁹. Ceci peut s'expliquer par le fait que les facteurs d'épissage soient eux-mêmes exprimés de manière différente en fonction des tissus considérés¹⁰⁹. La phosphorylation de ceux-ci peut faire varier leur localisation intracellulaire et ainsi intervenir dans le caractère tissus-spécifique de l'épissage alternatif¹⁰⁹.

II-La régulation de l'épissage

La régulation de l'épissage fait intervenir différents facteurs. La reconnaissance et la sélection des sites d'épissage sont régulées par des facteurs intervenant à différentes étapes de l'assemblage du spliceosome^{109,101}.

La reconnaissance de sites d'épissage se fait avec l'aide d'éléments cis et de facteurs trans. Les séquences des éléments cis se trouvent aussi bien dans les introns que dans les exons et peuvent favoriser l'épissage notamment en permettant le recrutement des sous-unités du spliceosome ou encore en inhibant l'assemblage du spliceosome, ce qui engendre ainsi le saut d'un exon¹⁰⁷. Les éléments qui favorisent l'épissage sont appelés exonic splicing enhancers (ESEs) lorsqu'ils sont situés dans un exon et intronic splicing enhancers (ISE)

lorsqu'ils sont situés dans un intron. Des éléments répresseurs de l'épissage se situent aussi dans les exons et les introns et sont respectivement appelés exonic splicing silencers (ESS) et intronic splicing silencers (ISS)¹⁰³.

Les facteurs d'épissage trans sont des protéines SR et des heterogenousnuclear RiboNucleoProteins (hnRNP)^{107,119,124}.

La découverte des protéines SR a été faite chez la *Drosophile* pour laquelle les gènes *Suppressor-of-white-apricot* (SWAP), *Transformer* (Tra) et Tra-2 ont été indentifiés comme facteurs d'épissage en 1987¹²⁵⁻¹²⁷. Les protéines de la famille SR, hautement conservées chez les eucaryotes, correspondent à une dizaine de protéines riches en répétition de motifs Arginine-Serine (domaines R-S) qui permettent la médiation de l'interaction avec l'ARN et les autres protéines^{109,124}. Elles sont également composées de motifs de reconnaissance de l'ARN (RRMs ou RNA-recognition motif) qui se lient spécifiquement à des séquences cibles de l'ARN¹²⁸. Les protéines SR sont nécessaires à l'épissage car elles permettent le recrutement des facteurs d'épissage formant le spliceosome fonctionnel et permettent le relais entre les différents facteurs et les sites d'épissage 3' et 5'. Elles sont situées dans le noyau et migrent vers les sites de transcription¹²⁸.

Les protéines SR se lient aux ESEs grâce à la reconnaissance du RRM^{101,109} induisant le recrutement des éléments constitutifs du spliceosome comme la sous unité U2AF qui se lie à la région riche en pyrimidines ou encore le U1snRNP sur le site d'épissage 5'¹¹⁹ (figure 19).

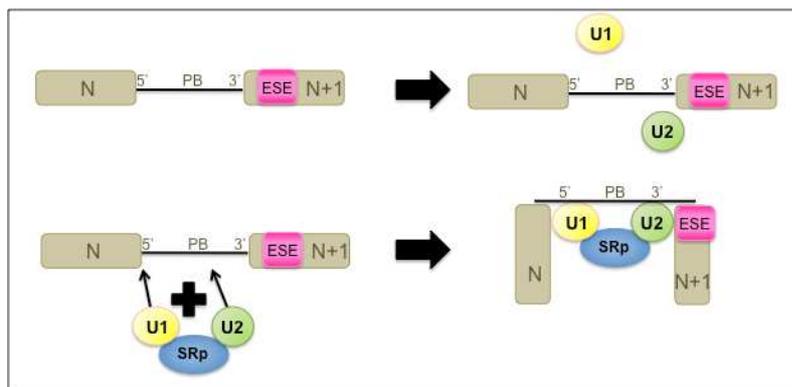


Figure 19 : Aide au recrutement des éléments du spliceosome par la présence de SR protéines (SRp). En absence de SR protéine, l'épissage n'a pas lieu. En revanche, en présence de SR protéine, les facteurs d'épissage sont conduits vers les sites d'épissage (PB=Point de Branchement), l'épissage peut avoir lieu.

Les protéines hnRNP sont des complexes d'ARN (snRNA) et de protéines. Elles sont impliquées dans de nombreux processus tels que le transport de l'ARN dans le noyau. Elles sont également capables de se lier à l'ARN pré-messager afin d'éviter la formation d'une structure secondaire de celui-ci, favorisant ou inhibant l'épissage notamment par encombrement stérique^{119,124}(figure 20).

Les ISSs et ESSs sont reconnues par des hnRNP. Ces protéines inhibent l'épissage par encombrement stérique ou par séquestration^{119,129} d'un ou plusieurs exon (figure 20). Dans ce dernier cas, des hnRNPs se lient à des ISSs présents sur des introns différents et par interaction protéine-protéine, l'exon compris entre les 2 introns concernés se trouve dans une boucle qui ne peut plus interagir dans le mécanisme d'épissage¹¹⁹.

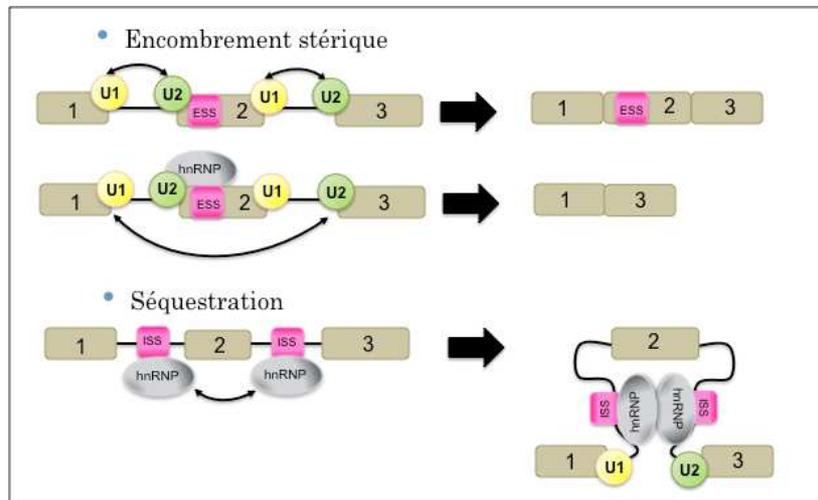


Figure 20 : Mécanismes de régulation d'hnRNP par liaison sur des ESS de l'ARN. A : mécanisme d'encombrement stérique menant à l'épissage alternatif. B : méthode de séquestration d'un exon par interaction protéine-protéine entre deux hnRNP.

Les ISE ne sont pas bien caractérisés. On sait toutefois qu'ils sont reconnus par les hnRNP, et induisent l'épissage¹⁰⁹. Les ISE sont généralement des répétitions de petites séquences telles que GGGGG, CUCUCU ou encore UGCAUG¹³⁰.

Un moyen d'inhibition de l'épissage est le blocage des sites d'épissages (site 3', 5', ou point de branchement) aux composantes du spliceosome¹⁰⁹. Différentes protéines sont capables de jouer ce rôle comme hnRNP F, hnRNP H, neuro-oncological ventral antigen 1 (NOVA1) et NOVA2, Forkhead box -1 (Fox-1) et Fox-2. Ainsi, Fox-1 et Fox-2, par exemple, sont des protéines qui inhibent la formation du complexe E' en empêchant SF1 de s'hybrider

sur son site spécifique sur l'ARN pré-messager et évitent également la formation du complexe E en annulant le recrutement de U2AF¹⁰⁹. Ces protéines sont spécifiquement actives dans le cœur, les cellules musculaires et le cerveau¹³¹. La protéine PTB (Polypyrimidine tract binding protein), également nommée hnRNPI, peut se fixer aux polypyrimidines régulant de façon négative l'épissage en inhibant la fixation des facteurs d'épissage^{124,129}.

La régulation de l'épissage se fait avec des protéines SR ou des hnRNPs, qui aident à la reconnaissance du site d'épissage et permettent la distinction entre les exons authentiques et les exons alternatifs^{107,129}. L'utilisation de sites d'épissage menant à l'inclusion ou non d'un exon est dépendante de l'action combinée des éléments cis et des facteurs d'épissage. En effet, de nouveaux sites d'épissage peuvent être créés à l'intérieur d'un intron par la présence des facteurs d'épissage. Les parties des séquences introniques ainsi déterminées sont considérées comme des exons alternatifs¹³². Les inhibiteurs et activateurs d'épissage peuvent agir par recrutement des facteurs d'épissage, par compétition avec des composants servant à l'épissage ou encore par changement de la structure de l'ARNm afin de gêner la reconnaissance du site d'épissage^{103,109}.

La régulation de l'épissage fait intervenir de nombreux facteurs. Ainsi, de nouveaux niveaux de régulation sont peu à peu découverts. Hormis tous ces facteurs régulateurs, différents groupes ont décrit récemment que l'épissage pouvait être affecté par les modifications post-transcriptionnelles, telles que la phosphorylation des facteurs de régulation et la structure secondaire de l'ARN^{103,109}. Une structure secondaire peut, en effet, empêcher l'accès des sites d'épissages aux protéines d'épissage, inhibant celui-ci ou au contraire, la structure peut induire le rapprochement des sites d'épissage (un intron peut être long), favorisant celui-ci. De plus, l'épissage alternatif est régulé par différents facteurs tels que la vitesse d'élongation de la transcription, les modifications des histones et de la chromatine. Ainsi, la modification des histones peut induire un recrutement ou une absence de recrutement de facteurs d'épissage^{133,134}. La vitesse d'élongation de l'ARN Polymérase II (RNAPII) contribue, dans une certaine mesure, à l'excision de certains exons. En effet, la transcription de régions denses en chromatine est plus lente ce qui implique l'épissage de sites faibles. Cependant, dans les régions pour lesquelles la chromatine est moins dense, la RNAPII transcrit plus rapidement l'ADN et induit un épissage rapide omettant les sites d'épissage faibles. De plus, des ARN non-codants (ARNnc) peuvent également contrôler l'expression de

facteurs d'épissage¹³⁴. Au vu de ces exemples, la régulation de l'épissage fait intervenir conjointement de nombreux facteurs et explique la poursuite des recherches sur ce sujet.

III- Une régulation spécifique : le Nonsense-Mediated Decay

Des contrôles qualité ont lieu à différentes étapes de l'expression d'un gène. Ils sont nécessaires au bon fonctionnement des cellules et permettent d'éviter la production de protéines aberrantes. Différents contrôles au niveau post-transcriptionnel permettent la dégradation d'ARNm non conformes et donnant des protéines potentiellement néfastes pour la cellule et son environnement. Le no-go decay (NGD) correspond au procédé selon lequel la structure de l'ARNm (structure secondaire, séquence riche en GC ou bases endommagées) induit une absence de traduction de la part du ribosome. Le non stop decay (NSD) quant à lui, induit un mécanisme de dégradation d'ARNm dépourvu de codon stop. Enfin, le nonsense-mediated decay (NMD) correspond à la dégradation d'ARNm ayant un codon stop prématuré ou une séquence poly(A) trop éloignée du codon stop¹³⁵. Le NMD est le mécanisme le plus décrit dans la littérature. Il s'agit d'un processus de régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm qui permet la dégradation d'ARNm anormaux, conséquences de mutations ou d'erreurs fréquentes lors de l'expression de gènes. Ce procédé permet de prévenir la production de protéines tronquées dont la fonction pourrait être néfaste pour la cellule et l'organisme. La prévention de la production de ces protéines permet notamment de moduler les manifestations cliniques de nombreuses maladies génétiques.

Le NMD joue un rôle de régulation de l'expression des gènes en éliminant des ARNm issus d'épissage alternatif notamment. Ce procédé NMD est important de part sa conservation dans différents organismes vivants, des bactéries aux cellules de mammifères.

1. Un codon stop prématuré

Le NMD est un procédé de surveillance efficace qui élimine sélectivement les transcrits qui contiennent des codons stop prématurés (PTC pour Premature Stop Codon)¹³⁶. Différentes situations sont décrites quant à la formation d'un PTC telles que l'épissage alternatif, des mutations ou encore l'utilisation d'un codon initiateur alternatif. Ainsi, une règle a pu être définie¹³⁷ décrivant la position du PTC comme déterminante pour le

déclenchement du processus NMD. Celui-ci doit se situer 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon pour déclencher la dégradation.

Lors de la première traduction de l'ARNm, si le complexe ribosomique rencontre un PTC en amont du dernier EJC, soit en amont de la dernière jonction exon/exon, il s'arrête. L'EJC recrute ensuite les protéines appelées up-frameshift protéines (UPF) qui jouent le rôle de plateforme d'accueil pour les protéines du NMD. Les EJCs sont éliminés au cours des différents passages de ribosomes pour la traduction. Ainsi seule la première lecture de l'ARNm permet la détection des EJC. Le facteur eIF4E remplace alors les protéines CBP80 et CBP20 sur la coiffe en 5' lors de l'élimination des EJC, au cours de la première lecture de l'ARNm. Ainsi, le phénomène NMD ne peut avoir lieu que lors de la première traduction appelée « pioneer round of translation ».

Les *trans*-acting facteurs du NMD sont les protéines UPF1 (= Rent1 chez la souris), UPF2 et UPF3. Ces 3 protéines forment un complexe trimérique qui apparaît comme étant le premier des facteurs du NMD à se fixer au ribosome¹³⁸. UPF1 et UPF2 sont des phosphoprotéines, dont le statut de phosphorylation d'UPF3 reste à caractériser. Le complexe SURF (SMG-1, UPF1, eRF1 et eRF3) se lie aux protéines UPF induisant la phosphorylation d'UPF1 par la protéine kinase SMG-1 (figure 21). UPF1 peut alors recruter SMG-5, SMG-6 et SMG-7. Il est décrit que SMG-7 a pour rôle de déphosphoryler UPF1^{102,136,138}. Cette phosphorylation/déphosphorylation d'UPF1 est nécessaire au déclenchement du mécanisme NMD¹³⁶. La phosphorylation d'UPF1 réprime la traduction en fixant la sous-unité eIF3 inhibant ainsi la formation d'un ribosome actif¹³⁶. UPF1 peut également réguler la stabilité de nombreux transcrits qui n'ont pas le profil NMD.

Après reconnaissance du PTC, SMG1 et UPF1 rejoignent l'EJC qui se situe à proximité (figure 21). Les signaux NMD sont¹⁰² l'association du complexe SURF sur le PTC, l'association de SMG1-UPF1 en amont de l'EJC, induisant la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 et finalement, cette phosphorylation d'UPF1 enclenche l'activation et le recrutement des facteurs du NMD.

Cette règle n'est toutefois pas universelle car il semble que les ARN messagers ayant une région 3' non traduite (3'UTR) étendue sont également ciblés par le mécanisme NMD. La distance entre le PTC et la queue poly(A) semble être aussi déterminante¹³⁹, suggérant que le codon stop puisse être considéré comme un PTC dans certains cas. Lorsque la protéine fixant le poly(A) (PABP) est à proximité du codon stop, eRF3 interagit avec PABP, ce qui inhibe

l'interaction entre eRF3 et UPF1. Cependant, lorsque le ribosome s'arrête au PTC, PABP ne peut pas interagir avec le complexe ribosomique sur lequel se trouve eRF3 en raison d'un trop grand éloignement et UPF1 peut fixer eRF3, induisant un processus NMD¹³⁹.

Le NMD peut également être déclenché par un défaut structural de l'ARNm. Ainsi, les ARNm susceptibles d'être traduits doivent comporter le complexe CBC composé des protéines fixant la coiffe, en 5', ainsi qu'une protéine fixant la queue poly A en 3' de l'ARNm. La perte de l'un de ces facteurs entraîne un défaut de la traductibilité du transcrit et sa capacité à être soumis au NMD¹¹². Cependant, il ne semble pas y avoir déclenchement de NMD lorsqu'un ARNm n'a pas de queue poly(A). Cette queue poly(A) ainsi que la protéine PABP (poly(A) binding protein) semblent avoir un rôle clef dans la régulation du NMD¹³⁸.

Le NMD est un mécanisme qui peut être inhibé par les antibiotiques tels que la cycloheximide et la puromycine car ceux-ci se fixent aux ribosomes et les inactivent. Le NMD est également inactivé par le poliovirus qui clive et inactive les facteurs de traduction eIF4G1, eIF4GII et PABP¹¹².

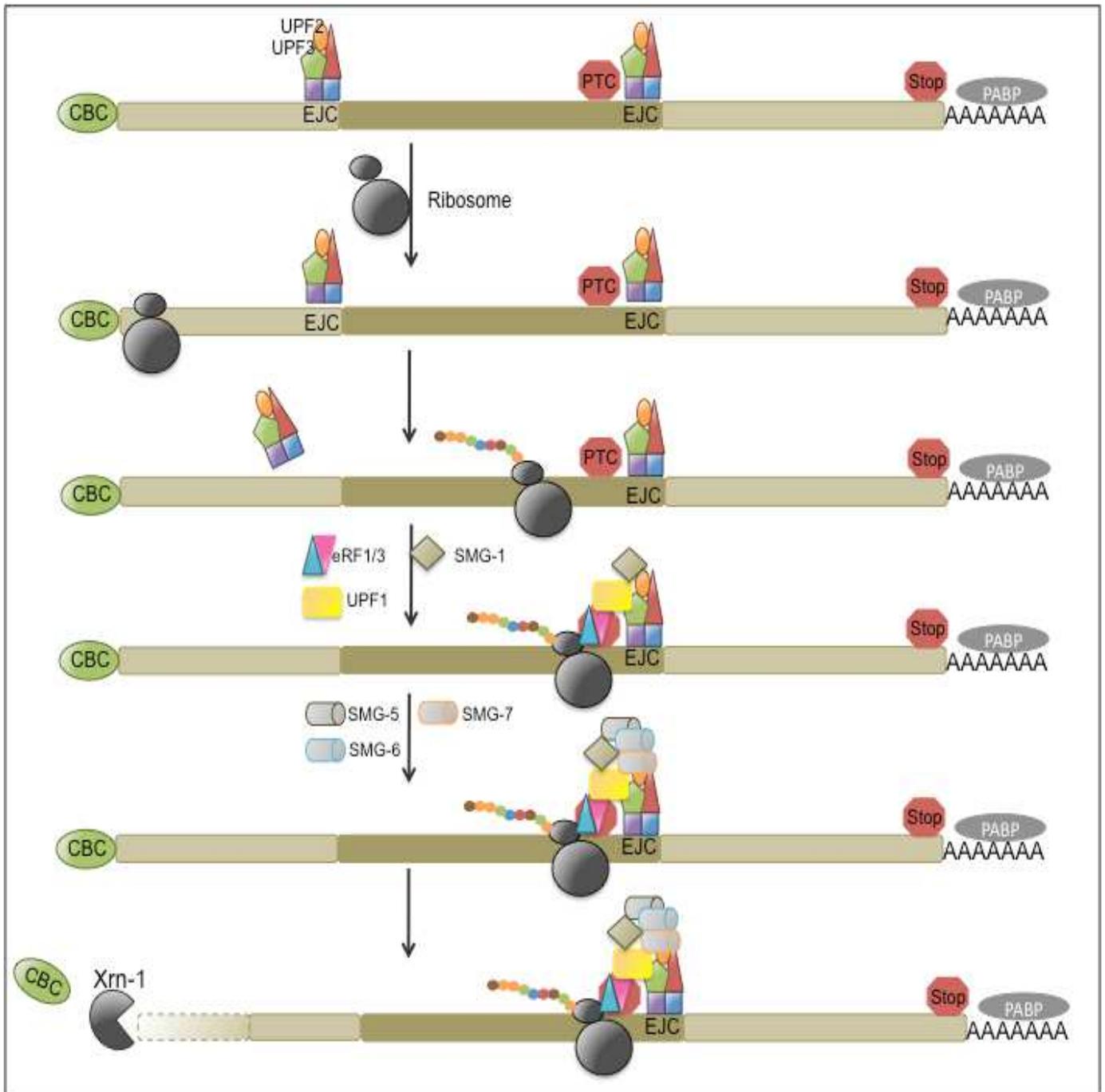


Figure 21 : Mécanisme NMD. Lors de la première lecture de l'ARNm par le ribosome, si celui-ci rencontre un codon stop prématuré, il déclenche le processus NMD. Dans ce cas, les protéines UPF1, SMG-1 et eRF1/3 sont recrutées et par action de phosphorylation et de déphosphorylation par SMG-5, 6 et 7, la dégradation de l'ARNm est induite, ceci par l'action de l'enzyme Xrn-1.

2. La dégradation de l'ARNm au cours du processus NMD

La dégradation de l'ARNm se fait tout d'abord par le décrochage de la coiffe en 5' par les enzymes Dcp1 et Dcp2. Ensuite, L'ARNm est dégradé par l'exonuclease de XRN-1 ayant une activité 5'-3'. Les enzymes Dcp1, Dcp2 et XRN-1 sont concentrées dans les foyers cytoplasmiques nommés « processing bodies ».

Plusieurs transcrits alternativement épissés et dégradés par NMD sont retrouvés en faible abondance et ne sont pas conservés entre la souris et l'humain¹⁴⁰. Le NMD peut être régulé, stabilisant les transcrits et les isoformes alternativement épissés en fonction des conditions physiologiques ou pathologiques. Cependant son mode de régulation n'est pas encore totalement élucidé et l'activité NMD peut varier entre différents types cellulaires et conditions physiologiques.

Ainsi, pour les patients souffrant de chondrodysplasie métaphysaire de Schmid, les ARNm de collagène X muté (introduction d'un PTC) sont soumis au NMD dans les cellules cartilagineuses alors qu'ils ne sont pas soumis au NMD dans les cellules non cartilagineuses (lymphoblastes et os)¹⁴¹.

La régulation de l'épissage alternatif fait intervenir de nombreux facteurs. Cependant, malgré la définition d'un code d'épissage et d'un code spécifique au NMD, une mauvaise utilisation de ceux-ci peut mener à des situations pathologiques.

IV- Les maladies associées à l'épissage alternatif

Des modifications de l'épissage sont impliquées dans des maladies génétiques. Ces modifications sont des mutations qui touchent les facteurs d'épissage, les séquences consensus des sites d'épissage ou encore les éléments auxiliaires tels que les sites de régulation de l'épissage (ESE, ISE, ESS ou ISS)¹²⁹. Ainsi, de nouveaux sites d'épissage peuvent être utilisés à l'intérieur d'un intron donnant lieu à la rétention de séquences introniques¹³². Les mutations touchant les facteurs et les sites d'épissage peuvent être associées à des maladies héréditaires ou cancéreuses¹⁴² qui peuvent être dues à la présence d'isoformes avec des fonctions antagonistes¹⁰⁹.

Les facteurs d'épissage NOVA régulent également l'épissage de nombreux gènes impliqués dans les fonctions des synapses comme l'adhésion ou le guidage de l'axone^{143,144}. Ainsi l'altération des facteurs de régulation de l'épissage mène à une mauvaise régulation de celui-ci entraînant un état pathologique. C'est de cette manière que de nombreux variants d'épissage ont été détectés dans différents cancers indiquant le rôle majeur des facteurs d'épissage dans la programmation cellulaire et la progression tumorale¹⁴³.

Grâce au développement des méthodes d'analyses, de nombreuses études ont montré que dans certains cancers, des variants de nombreux gènes sont exprimés différemment dans une cellule cancéreuse par rapport à une cellule saine¹³². Cependant il est délicat de déterminer si l'épissage alternatif est la cause ou la conséquence du cancer¹⁴⁵. L'exemple le plus connu d'épissage alternatif lié au cancer concerne le gène BRCA1 pour lequel une mutation affecte un site de fixation du facteur d'épissage SF2, provoquant la délétion de l'exon 18 de l'ARNm¹⁴⁶. Le gène BRCA1 permet notamment la réparation de l'ADN muté. Ainsi l'épissage alternatif de ce gène mène à une protéine plus courte incapable d'assumer sa fonction de réparation d'ADN, auquel cas des mutations non corrigées mènent au développement de tumeurs. Les cellules tumorales sont capables d'échapper aux mécanismes de régulation de l'expression génique pour se développer et coloniser leur milieu. Ainsi, l'altération de l'épissage du gène FGFR2 est impliquée dans la transition épithéliale-mésenchymale, une étape importante de la formation de métastases dans la progression tumorale¹⁴⁷. De même la survivine est une protéine anti-apoptotique pour laquelle deux variants d'épissage sont connus. L'un d'entre eux conserve le rôle anti-apoptotique de la survivine tandis que le second à un rôle pro-apoptotique. Dans le cas du cancer du sein, Végran *et al.*¹⁴⁸ ont montré que l'altération de l'expression des variants d'épissage de la survivine est associée à des mutations du facteur de transcription p53. Ainsi les cellules tumorales peuvent échapper aux signaux d'apoptose et se développer.

Un autre exemple est celui de la mucoviscidose, qui est une maladie pour laquelle des mutations des sites d'épissage dans le gène CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) induit l'utilisation de site cryptique générant une protéine partiellement fonctionnelle responsable des atteintes pulmonaires^{142,149}.

V-Les cytokines fortement sujettes à l'épissage alternatif

Le rôle pléiotropique de nombreuses cytokines, leur action sur différentes cellules, tissus ou organes, leurs effets locaux ou systémiques, expliquent la complexité du système. Depuis quelques années, l'épissage alternatif a été découvert et permet d'appréhender d'une autre manière la connaissance et les contradictions concernant certaines cytokines. Pour de nombreuses cytokines, des variants d'épissage ont, en effet, été décrits : IL-2¹⁵⁰, IL-4⁷⁴, IL-6¹⁵¹, IL-7¹⁵², IL-24¹⁵³, IL-32¹⁵⁴, TGF- β ¹⁵⁵... Les variants d'épissage des ARNm des différentes cytokines ont un large potentiel de fonctions et d'implications comme la régulation de l'expression et de la sécrétion de protéines, une distribution contrôlée dans les tissus ou à différents stades du développement cellulaire ou encore une fonction antagoniste ou agoniste à la forme native de la cytokine. Le variant IL-7 δ 5 agit en effet comme un super agoniste de l'IL-7. D'autres variants d'épissage de l'IL-7 sont connus : l'IL-7 δ 4, l'IL-7 δ 3,4, l'IL-7 δ 4,5 et l'IL-7 δ 3,4,5 mais leur fonction reste à déterminer¹⁵². Par opposition, pour l'IL-2, ses deux isoformes (l'IL-2 δ 2 et l'IL2 δ 3) sont, quant à elles, des antagonistes de l'IL-2^{150,156}.

Les variants d'épissage des cytokines peuvent être exprimés différemment dans les tissus et les cellules immunitaires. Ainsi on retrouve l'IL-7 canonique dans la plupart des organes alors que l'IL-7 δ 4 et IL-7 δ 3,4 sont présents dans les ovaires, l'IL-7 δ 4 et IL-7 δ 4,5 sont présents dans le colon¹⁵². L'IL-4 δ 2 est quant à lui préférentiellement exprimé dans les voies respiratoires et le thymus⁷⁴.

L'épissage alternatif peut être très conservé entre les espèces, mais peut également être très différents d'une espèce à une autre. En effet, le cas de l'IL-6 est assez éloquent : trois variants existent chez l'homme, l'IL-6 δ 2, l'IL-6 δ 4 et l'IL-6 δ 2,4¹⁵¹, alors que chez la souris, deux variants sont connus, l'IL-6 δ 3 et l'IL-6 δ 5^{157,158}.

Les récepteurs de cytokines sont également très marqués par l'épissage alternatif comme pour le récepteur du GM-CSF qui possède un variant délété des exons 8 à 11¹⁵⁹. Les récepteurs de cytokines et les cytokines sont sujets à l'épissage alternatif menant à un large spectre de fonctions et de dysfonctionnements possibles.

L'épissage alternatif qui conduit à la production de multiples isoformes issues d'un seul gène est un mécanisme fortement utilisé dans le cas des cytokines et de leurs récepteurs.

OBJECTIFS DU
TRAVAIL DE
THESE

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Une bonne caractérisation de la réponse immunitaire est primordiale dans un contexte de vaccinologie. La réponse immunitaire est caractérisée par la sécrétion de cytokines qui se trouvent être au centre de la communication intercellulaire du système immunitaire. L'intérêt porté aux variants d'épissage des cytokines permet non seulement l'amélioration de la compréhension, de la caractérisation et de la détection de la réponse immunitaire, mais aussi de la compréhension de certaines pathologies dans lesquelles ils sont impliqués ainsi que l'élaboration de tests diagnostiques et de traitements.

Le phénomène d'épissage alternatif est extrêmement régulé au cours du temps, en fonction du tissu et du contexte. La fonction des isoformes produites à partir des variants n'est pas toujours connue ou lorsqu'elle l'est, s'avère souvent être différente, voire antagoniste, de celle des protéines complètes. Le suivi de l'expression relative des différents isoformes des cytokines est un facteur important pour une bonne caractérisation de la réponse immunitaire. Il s'avère donc nécessaire d'utiliser des outils discriminants afin de prendre en compte l'expression relative de chaque isoforme dans le but de s'affranchir de tout biais dans les dosages. Or les techniques actuelles, impliquant un dosage de cytokines, ne prennent pas en compte la présence des variants d'épissage de ces mêmes cytokines.

Afin de caractériser les variants d'épissage des cytokines cibles des réponses Th1 et Th2, nous avons décidé de mener une étude sur une cytokine modèle: l'interleukine-4 (IL-4). Ce choix est justifié par le fait qu'il s'agit de la cytokine caractéristique du phénotype Th2, qu'elle possède relativement peu d'exons, et qu'un seul variant lui est connu jusqu'à aujourd'hui. L'IL-4 δ 2, variant d'épissage de l'IL-4 délété de l'exon 2, a été pour l'instant relativement peu étudié. Sa forte conservation entre les espèces lui confère un intérêt particulier et laisse penser à un rôle potentiellement important et identique chez différentes espèces.

La première étape de ce travail a été de mettre en place des outils spécifiques pour la détection et la quantification de variants d'épissages et discriminants des 2 formes de l'IL-4. Pour cela, un test qPCR a été mis en place. Il a également fallu produire l'IL-4 et son isoforme, l'IL-4 δ 2, sous forme recombinante afin de pouvoir étudier leurs fonctions et effets. Différents systèmes d'expressions ont donc été testés sans succès, posant la question de l'expression de la protéine. Seule la bactérie *E.coli* SHuffle a permis l'expression des 2

variants. Après purification des protéines recombinantes, des tests de proliférations ont été effectués. La littérature montre, en effet, que l'IL-4 δ 2 agit comme un antagoniste naturel de l'IL-4^{41,74} par inhibition de la prolifération des lymphocytes T. Cependant durant ce travail de thèse, une étude menée par le groupe d'Atamas a montré un rôle agoniste *in vivo* chez la souris⁷⁹. Un premier objectif de ce projet a donc été d'approfondir les études de fonctionnalité de l'IL-4 δ 2 sur la prolifération cellulaire par utilisation d'un test différent de l'incorporation de thymidine tritiée.

Parallèlement, un deuxième objectif a été de comprendre les mécanismes cellulaires induits par l'IL-4 δ 2. Pour cela, nous avons mené une étude sur les voies de signalisation Jak/STAT et Ras/MAPK par IRS2 afin de déterminer le potentiel de l'IL-4 δ 2 à induire l'une de ces voies qui sont induites par l'IL-4.

Finalement, un dernier objectif a été de déterminer l'expression de l'IL-4 δ 2 *ex vivo* chez l'homme. Aucune étude cinétique n'a été réalisée sur l'expression de l'ARNm de ce variant. De ce fait, le dosage des variants au cours du temps a été réalisé sur des lymphocytes T de personnes saines afin de déterminer l'état basal. Cette étude a été réalisée dans le but de comparer l'expression des variants de l'IL-4 de personnes saines avec l'expression de ces mêmes variants chez des personnes asthmatiques. Toutefois, un article de Luzina *et al.*, portant sur une approche très similaire sur des patients asthmatiques, publié début 2012, indique un manque de corrélation des niveaux d'expression de l'IL-4 et de l'IL-4 δ 2 entre les différents donneurs.

Durant ce travail sur les variants de l'IL-4, de nouveaux variants d'épissage de l'IL-4 ont été découverts. L'un d'eux a particulièrement retenu notre attention : l'IL-4v2. Par épissage alternatif, un nouvel exon est retenu dans ce variant. Son étude a mis en évidence qu'il est sujet au NMD, ce qui a permis d'apporter un niveau supplémentaire dans la compréhension du système de régulation de l'IL-4.

Suite à cette découverte, il nous est apparu important de faire un bilan de tous les variants de l'IL-4. Grâce aux avancées technologiques récentes sur le séquençage, nous avons décidé d'utiliser le séquençage nouvelle génération pour aller en profondeur dans la connaissance des variants de l'IL-4 et de nombreuses autres cytokines.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

PARTIE I

New insights of human IL-4 δ 2 functionality as IL-4 inhibitor

Hauvespre C., Dixneuf A., De Luca K., Courtois V., Gafa V., Legras Lachuer C., Sodoyer R.

Article non soumis

Un variant d'épissage de l'IL-4 pour lequel l'exon 2 est délété a été découvert chez différentes espèces. Ce variant également décrit dans différentes populations cellulaires n'a été que très peu étudiée jusqu'alors. Cependant l'IL-4 δ 2 semble être présent dans différentes pathologies telles que l'asthme ou la tuberculose. Afin de mener une étude complète et approfondie sur l'implication de l'IL-4 δ 2 dans le cas de l'asthme, pathologie dans laquelle l'IL-4 est fortement présent, nous avons mis au point une qPCR spécifique discriminant les 2 variants dans un échantillon. En effet, la spécificité des outils utilisés dans les différentes études de la littérature n'est souvent pas démontrée^{89,160}. Dans notre cas, des amorces de qPCR ont été définies pour chaque variant et leur spécificité a été validée pour attester de la robustesse de cet outil. Afin de mieux comprendre l'expression de ce variant nous avons effectué une étude cinétique sur des échantillons de lymphocytes T de personnes saines activés sur 3 jours, ceci dans le but d'établir l'état basal de l'expression de ce variant chez des personnes saines, afin de le comparer à des situations pathologiques. L'étude cinétique révèle un caractère donneur-spécifique de l'expression des deux variants IL-4 et IL-4 δ 2. En effet, une différence de profil est observée pour tous les donneurs suggérant une variabilité significative du niveau des ARNm de l'IL-4 et de l'IL-4 δ 2 chez des personnes saines après stimulation cellulaire. L'étude sur des patients asthmatiques n'a pu être réalisée dans le temps imparti. Toutefois, nous avons poursuivi l'étude de l'expression de ce variant chez l'homme dans différents types cellulaires. En effet, l'IL-4 δ 2 a été retrouvée jusqu'alors dans des PBMC et des lymphocytes T mais un manque d'information sur les cellules productrices de ce variant est à noter. Ainsi, après tri cellulaire, l'IL-4 δ 2 a été détectée dans des PBMC mais pas dans les cellules CD4⁺ et CD8⁺ du même donneur. Un type cellulaire présent dans les PBMC, autre que les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, semble exprimer l'IL-4 δ 2. Toutefois, l'IL-4 δ 2 est retrouvée dans les granulocytes d'un autre donneur suggérant sa production par les basophiles ou les éosinophiles.

L'expression de l'IL-4 δ 2 a été essentiellement étudiée au niveau de l'ARN messager. Une étude récente a mis en évidence l'expression de la protéine IL-4 δ 2 chez des personnes asthmatiques⁸⁰. Dans le cas de son expression *in vivo*, dans le but d'une utilisation thérapeutique, ou dans le cas d'une meilleure caractérisation de la réponse immunitaire, il est important de connaître la fonctionnalité de la protéine IL-4 δ 2. Jusqu'à présent, la fonctionnalité de ce variant n'a pas été clairement définie. En effet, les premières publications sur le sujet attribuent un rôle antagoniste à l'IL-4 δ 2 vis à vis de l'IL-4. Les premiers tests effectués à la thymidine tritiée montrent une inhibition des fonctions de l'IL-4 en présence d'IL-4 δ 2^{41,74,75}. Toutefois, des informations contradictoires sont également apportées. L'IL-4 δ 2 serait aussi capable d'induire la production de collagène par les fibroblastes, de la même manière que l'IL-4⁷⁷. Récemment, l'équipe d'Atamas a réalisé des tests *in vivo* chez la souris montrant une influence similaire de l'IL-4 et de son variant sur l'accumulation des lymphocytes T au niveau pulmonaire, par contre, l'induction des cytokines est différent en fonction de l'exposition à ces deux cytokines⁷⁹. Ainsi certains auteurs suggèrent que l'IL-4 δ 2 peut être un agoniste et un antagoniste de l'IL-4 en fonction de son affinité pour le récepteur sur différents types cellulaires⁷⁸. Ces différentes études relèvent une incertitude quant à la réelle fonction de cette isoforme. Il s'est donc avéré nécessaire d'éclaircir son rôle et son implication dans la réponse immunitaire vis-à-vis de l'IL-4. Afin de mener une étude sur la fonctionnalité de la protéine IL-4 δ 2, les protéines de l'IL-4 et de l'IL-4 δ 2 ont été produites de façon recombinante. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure de produire la protéine IL-4 δ 2 dans des systèmes eucaryotes comme les cellules HEK et le parasite *Leishmania tarentolae*, contrairement à l'IL-4. Ceci pose la question de la capacité de cette protéine à être produite *in vivo* chez l'homme et de la dégradation potentielle de son ARN messager. Cependant, la protéine recombinante IL-4 δ 2 a pu être produite en système bactérien dans les bactéries SHuffle, modifiées pour permettre la conformation des protéines au sein du cytoplasme.

La fonctionnalité de l'IL-4 δ 2 a été étudiée par sa capacité à induire une voie de signalisation suite à l'engagement avec le récepteur à l'IL-4 présent à la surface de la lignée cellulaire TF-1. Dans nos conditions, cette isoforme moléculaire n'a pas été capable d'induire les voies de signalisation classiquement induites par l'IL-4 à savoir l'activation de STAT-6, d'IRS2 et de STAT-5. L'absence d'émission de signal similaire à l'IL-4 par l'IL-4 δ 2 corrobore l'hypothèse d'un rôle inhibiteur par compétition avec l'IL-4 au niveau du récepteur.

New insights of human IL-4 δ 2 functionality as IL-4 inhibitor

Hauvespre C.¹, Dixneuf A.¹, De Luca K.¹, Courtois V.¹, Gafa V.², Legras Lachuer C.³, Sodoyer R.¹

1- Sanofi Pasteur, Marcy l'Etoile, France

2- EA 4683, SFR-CAP-Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

3- ProfileXpert-LCMT, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Lyon, France

KeyWords

Interleukin-4, alternative splicing, quantitative polymerase chain reaction, signaling pathways

ABSTRACT

An alternatively spliced variant of human interleukin-4 (IL-4), lacking the exon 2, has been described as IL-4 δ 2. Described as an IL-4 antagonist as well as an agonist, IL-4 δ 2 is not yet classified as Th1 or Th2 cytokine. This can be explained by the lack of specificity of the tools used. IL-4 and its splice variant IL-4 δ 2 are very similar at mRNA and protein level, and specificity of primers or antibody needs to be highly selective in such studies. We set up an IL-4 δ 2 specific qPCR. This tool was used for a kinetic study of IL-4 δ 2 and IL-4 mRNA expression in activated T lymphocytes and showed that the mRNA expression level of IL-4 and IL-4 δ 2 was specific to donor. Different attempts to express IL-4 δ 2 as recombinant protein by eukaryotic cells failed, raising question on its potential secretion *in vivo*. However IL-4 δ 2 recombinant protein expressed in bacteria was not able to induce TF-1 cell proliferation as IL-4 does. Moreover, this bacterial recombinant IL-4 δ 2 induces neither STAT-6, STAT-5 nor IRS2 signaling pathways. This study provides new insight on the IL-4 δ 2 functionality and on the mechanistic effects of IL-4 alternatively spliced variant.

INTRODUCTION

Interleukin-4 (IL-4) has been initially discovered as B-cell growth factor 1 (BCGF-1) because of its stimulation and growth activation of B cells¹. Later, new functions on T cells have been attributed to this B cell factor, leading to its affiliation as a member of the cytokine family as interleukin-4 (IL-4)² in 1986. Important cytokine of the immune system, IL-4 is secreted by activated T cells³, mast cells⁴, basophils^{5,6} and eosinophils⁷. This pleiotropic cytokine regulator of immunity is characterized by a broad spectrum of functions on several cellular types. The key role of IL-4 is the Th2 polarization from Th0 cells^{8,9} and the down-regulation of pro-inflammatory Th1 responses by inhibiting macrophage activation and production of Th1 cytokines¹⁰. This cytokine also induces the proliferation and maintenance of T cells^{2,11,12}, the immunoglobulin class switch in B-cells from IgM to IgG4 and IgE^{13,14} and the up-regulation of the expression of CD23 on mast cells and B cells¹⁵. IL-4 plays additional roles, like the increase of the expression MHC class II molecules¹⁵ and IL-4R on cell surface¹⁶. According to its widespread effects, IL-4 is involved in various immune reactions and diseases, such as allergy¹⁷, asthma¹⁰, tuberculosis¹⁸, parasitic infections^{19,20} and pulmonary fibrosis²¹.

The gene encoding *Il4*, located on the 5th chromosome, consists of four exons and 3 introns leading to a 921-bases mRNA² and to a 12 to 22kDa protein, depending on the glycosylation state of the protein²². The protein is structured in 4 α -helix (named A, B, C and D) and 1 β -sheet²³, following a up-up-down-down pattern. Three disulfide bonds are present in the protein: Cys3-Cys127, Cys24-Cys65, Cys45-Cys99. Moreover, IL-4 is very similar to IL-13 (25% of homology). These two cytokines share a cell surface receptor and by consequences intracellular pathways. These similitudes lead to common biologic activities¹³.

Binding of IL-4 with its specific receptor IL-4R α induces a hetero-dimerization with the common γ c chain to give the type I receptor, IL-4RI, or with the IL-13R α I to give the type II receptor, IL-4RII which is a receptor shared with IL-13. IL-4 fixation is nearly exclusive for the IL-4R α chain, even if the the hetero-dimerization with the γ c chain or the IL-13R α 1 is mandatory for the signal transduction²⁴.

The formation of a cytokine-receptor complex induces several signaling pathways. The Jak/STAT pathway allows a cell differentiation, while IRS/PI3K pathway and IRS/AKT pathway allow cell growth and cell survival. In the Jak/STAT pathway, Janus Kinases 1, 2 and 3 binds respectively to IL-4R α , IL-13R α and the γ c chain. These kinases recruit and phosphorylate STAT-6 molecules that binds to IL-4R α on a dock composed of Y575, Y603 and Y631 also called Y2 to Y4²⁵. For the pathway involving IRS, IRS proteins bind to IL-4R α on Y497 (or Y1) where it can be phosphorylated by Janus Kinases. Phosphorylated IRS can induce two pathways: the first activates PI3K and AKT to inhibit apoptosis and the second activates Ras, MEK and ERK to stimulate growth^{17,25}.

An alternatively spliced variant of human IL-4, lacking the shortest exon, exon 2, has been described²⁶ in peripheral blood mononuclear cells. This variant, called IL-4 δ 2, has been isolated in several human cell types such as T cells²⁷, and thymocytes²⁸. IL-4 δ 2 is preferentially expressed in thymus²⁹ and detected in lungs by bronchoalveolar lavages²⁹. Firstly discovered in humans, IL-4 δ 2 mRNA is naturally expressed in other species such as chimpanzee³⁰, cynomolgus^{30,31}, rabbit³², mouse³³ and cattle³⁴. Deletion of exon 2 does not disrupt the IL-4 reading frame²⁶, leading to a protein deleted of aminoacids 22 to 37²⁸. This splicing induces the loss of the major part of the loop between helix A and helix B and a part of the β -sheet²³. Two hypotheses are in opposition on the structural pattern of this splice variant. Zav'yalov *et al.* propose a down-up-down-up model in which the helix A is upside down²³. On the contrary, Vasiliev *et al.* propose a conservation of the structural pattern of

full-length IL-4 (up-up-down-down)²⁸. The IL-4δ2 protein structure is controversial in the literature. However, the changes affecting the binding of IL-4δ2 to IL-4Rα induce a lower affinity for the receptor compared to IL-4^{28,29}. The binding of IL-4δ2 on IL-4Rα can obstruct the action of IL-4 suggesting an inhibitory role of IL-4δ2. In fact IL-4δ2 inhibits IL-4 effects in lymphocytes proliferation^{28,35}. Significantly higher amounts of IL-4δ2 are required to impact the IL-4 binding on the receptor. Moreover, IL-4δ2 inhibits IL-4 induced IgE production and CD23 expression by B cells³⁶. Considering these IL-4 antagonistic effects, IL-4δ2 can be classified as a Th1 cytokine. However a recent study in mouse indicates that human IL-4δ2 is active *in vivo*, inducing the accumulation of T cells in lung, as well as IL-4 and also causes collagen production reflecting similar effects³⁷. But unlike IL-4, IL-4δ2 does not induce pulmonary eosinophilia and Th2 cytokines accumulation.

IL-4δ2 expression was mainly investigated at the mRNA level as no specific antibody was available to discriminate with IL-4 protein. Very recently, Atamas and colleagues published the detection of IL-4δ2 protein using an anti-IL-4δ2 antibody³⁸ specifically produced.

In this study, two axis have been developed. First, the mRNA expression of IL-4δ2 has been investigated in T cells from healthy donors. Secondly, to understand the regulation mechanism employed by IL-4δ2, functionality and receptor signaling have been studied.

MATERIEL AND METHODS

Cell culture

TF-1 cells (ATCC n°CRL-2003) were cultured in RPMI 1460 medium (Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 50µg/ml streptomycin, 50U/ml penicillin (Gibco), and 5ng/mL of Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Peprotech) at 37°C, 5% CO₂.

HEK293T cells (ATCC n°CRL-11268) were cultured in DMEM F12 (Gibco) with Glutamax supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 50µg/ml streptomycin, 50U/ml penicillin (Gibco), at 37°C, 5% CO₂.

Leishmania tarentolae cells were cultured at 26°C in LEXSY BHI medium (Jena Bioscience) supplemented with 5µg/mL of Hemin (Jena Bioscience), 100µg/mL of LEXSY Nourseothricin (Jena Bioscience), 100µg/mL of LEXSY Hygro (Jena Bioscience), 50µg/ml streptomycin, 50U/ml penicillin. Antibiotic selection was realized with 100µg/mL of LEXSY Néo (Jena Bioscience).

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) were isolated using Ficoll. T cells were sorted using magnetic anti-CD3 beads (Myltenyi Biotech) and activated with anti-CD3 and anti-CD28 (BD Pharmingen) during 1, 2 or 3 days. Flow cytometry analyses validated the cell sorting.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted with Ribopure (Ambion) and treated with Turbo DNA-Free (Ambion) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was verified using RNA Nano chip for Bioanalyzer (Agilent). One µg of DNase-treated RNA was used for first-strand cDNA synthesis using random hexamer primers and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) following manufacturer's instructions. RT was controlled with amplification of EEF1G using primers described in table1 (annealing at 60°C, 35 cycles).

IL-4 and IL-4 δ 2 were amplified with primers from ATG to stop (Table1) with Go Taq (Promega) and with a hybridization step of 60°C and 35 cycles.

Quantitative PCR

qPCR primers listed in the table 2 were purchased at Eurofins. Analyses by qPCR were realized with quantitect Syber PCR (Qiagen) in Stratagene Mx3005 with an hybridization temperature at 63°C. Primer efficiency was determined by the $\Delta\Delta Cq$ method³⁹. Relative quantification was calculated with standards and the reference gene GUSB. All samples were tested in duplicates.

Reference genes were chosen with Taqman Express plate endogenous control (Applied). These plates were run on PBMC and T cells samples.

Cytokine production

Plasmids construction

IL-4 and IL-4 δ 2 cDNA sequences were previously cloned from PBMC of healthy donors. These sequences were introduced in three different plasmids in order to express in a bacterial system (vector derivated from pET28 vector), in mammalian cells (pcDNA3.1) and in *Leishmania tarentolae* eukaryotic system (Jena Bioscience).

Cloning strategy for eukaryotic expression

The pcDNA3.1 plasmid is used for IL-4 and IL-4 δ 2 expression in HEK 293T. A Kozak sequence is added at the 5' position before the translation start site. A HisTag sequence at the C-terminus position is added for protein detection and purification. The PCR amplification was realized with Accuprime Taq (Invitrogen) with a hybridization temperature at 58°C and with 35 cycles. The insert is ligated in pcDNA3.1 plasmid and competent bacteria NEB10- β (Biolabs) were transformed by 2 μ L of this new plasmid. After a midi preparation with Nucleobond Xtra Midi EndoFree kit (Macherey Nagel), clones were validated by sequencing with Applied 3500.

For *L.tarentolae* expression, IL-4 and IL-4 δ 2 sequences are cloned in the pLEXSY-I-neo2 plasmid similarly. Human signal sequence of IL-4 for protein secretion is not amplified and a specific *L.tarentolae* secretion signal sequence already present in the plasmid is used for protein secretion. A HisTag sequence at the C-terminus position is added for protein detection and purification.

Cloning strategy for prokaryotic expression

IL-4 and IL-4 δ 2 sequences were cloned into a plasmid derived from pET28 for prokaryote expression. A pelB signal sequence replacing the human signal sequence of IL-4 was added at the N-terminus position in order to target the expression of the protein into the periplasm compartment of the bacteria. A HisTag sequence was also added at the C-terminus position. Plasmid and insert were ligated and competent bacteria NEB10- β (Biolabs) were transformed by 2 μ L of the new plasmid. After a midi preparation with Nucleobond Xtra Midi EndoFree kit (Macherey Nagel), clones were validated by sequencing with Applied 3500.

Expression

Expression in human cells

Twenty-four hours before transfection, 2.10⁵ HEK293T cells/well were seeded in a six-well plate and transfected using Fugene (Roche) with plasmids containing IL-4 sequence, IL-4 δ 2 sequence or empty pcDNA3.1 plasmid (called mock) for negative control. GFP plasmid (Lonza) was also transfected and transfection efficiency was analyzed by flow cytometry. Supernatants and cells were collected 24 and 48 hours after transfection. Cells lysates were

kept in IP-RIPA (Thermo Scientific) for protein study or in Tri Reagent (Ambion) for RNA study.

Expression in *L. tarentolae*

Parasites were nucleoporated using Amaxa Nucleofector II. Protein expression was induced using tetracycline (100µg/mL) and parasites were cultured at 26°C. Samples were taken 48 and 72h after induction. Supernatant were concentrated 30x using vivaspin columns (Sartorius).

Expression in prokaryotic system

SHuffle T7 Express Competent *E.coli* (Biolabs, C3029) were transformed with the different plasmids. Bacteria were culture at 30°C, expression was inducted with IPTG, and cultures were collected 4 hours after induction.

Western blot analysis

IL-4 and IL-4δ2 proteins were analyzed using mouse anti-human IL-4 (BD Pharmingen) and secondary antibody goat anti-mouse HRP conjugated (Jackson) or with antiHisTag HRP conjugated (Sigma). Western Blots were revealed with Opti-4CN (Bio-rad).

Purification of recombinant proteins

His-Tagged proteins expressed in SHuffleT7 express *E.coli* were purified using HisTrap Nickel column (GE Healthcare). The column was eluted with Tris, HCl (50mM), NaCl (500mM), Imidazole (500mM), urea 6M buffer. Several dialyses were realized to obtain a PBS 1X, Arginine 0.5M buffer. Lipopolysaccharides (LPS) were quantified using Endosafe – PTS (Charles River) based on LAL method.

IL-4 and IL-4δ2 concentrations were estimated with a quantitative Western Blot on Odyssey (Li-cor) using monoclonal mouse Anti Human IL-4 (DB Pharmingen) and anti-mouse Alexa Fluor 700 (Invitrogen).

Functionality assays

CFSE proliferation test

TF-1 cells were labeled with CFDA,SE (Invitrogen), and activated with 0.1, 1, 5, 15 or 45 ng/mL of GM-CSF (Peprotech), recombinant IL-4 (Invivogen), IL-4 and IL-4δ2 produced in SHuffle bacteria. Analyses of CFSE staining were performed everyday during 4 days by flow cytometry. Data were analyzed using FlowJo software. Viability was analyzed by adding Propidium Iodide (BD Pharmingen) on cells.

Study on signaling pathways

Cells were activated with 200ng/mL of purified IL-4 or IL-4δ2 produced in SHuffle bacteria and or commercial recombinant IL-4 (cell signaling) during 5 or 15 minutes in a culture media depleted from GM-CSF. Proteins were extracted in IP-RIPA with anti-phosphatase and anti-protease cocktail (Thermo Scientific). Total proteins were quantified using Bradford method (Bio-Rad) and 40µg of total extract was analyzed on SDS page gel. Western blot were revealed using anti STAT-6, anti-phospho-STAT-6, IRS2, STAT-5 and anti-phospho-STAT-5 (Cell Signaling) and anti-phospho-IRS2 (Genetex). Secondary antibody was an anti-rabbit IR Dye (Rockland) and Western Blot was revealed using Odyssey (Li-cor). On the same membrane and as a positive control β-actin was revealed with anti-β-actin antibody HRP conjugated. Revelation was realized with OPTI4-CN (Biorad).

Ex vivo cytokine expression

Blood from healthy donors were used for cell sorting. From the same donor, PBMC were extracted and CD4+ and CD8+ cells were sorted using FACSAria. Granulocytes from a second donor were sorted using polymorphoprep.

RNA was extracted and cDNA were synthesized as previously described.

RESULTS**Expression of IL-4 and IL-4 δ 2 *ex vivo* in human samples*****Design of specific primers for qPCR analysis***

High specificity of primers is essential to quantify closely similar alternative splice variants such as IL-4 and IL-4 δ 2. qPCR primers have been designed to amplify specifically each variant. Primers have to target specific regions for each variant to avoid non-specific amplification. For IL-4 specific amplification, the forward primer is located in the second exon and the reverse primer is located in the third exon (Figure 1). These primers distinguish between IL-4 and IL-4 δ 2 that is deleted of exon 2. The specificity of IL-4 δ 2 primers is due to the location on the region overlapping exon 1 and 3. The redundancy of the 3 last bases at the end of the exon 1 and 2 (AAG) due to the 5' splice sites makes it a difficult task to target the exon junction. Based on experience, 6 bases on the 3' end of the primer overlapping an exon/exon junction is sufficient to hybridize non-specifically even at a high hybridizing temperature. From this observation, we designed a primer with only 4 bases on the exon on the 3' position of the junction. This reverse primer is coupled with a forward primer in exon 1.

Specificity of the primers was tested on plasmids containing the sequences of IL-4 or IL-4 δ 2. Primers were validated by an absence of amplification on plasmid that does not contain the sequence of the variant targeted and by observation of the dissociation curve that assure the amplification of a single product. This was confirmed by PCR migration profile on agarose gel at the end of the qPCR amplification. Amplification was realized on 0.02fmol of plasmid in order to have similar quantities than those found in human samples.

The specificity of IL-4 primers was validated by amplification on IL-4 sequence but not on IL-4 δ 2 sequence (Figure 2, A and B). With the dissociation curve, we showed the amplification of a single product (Figure 2C) and this was further validated on agarose gel (Figure 2D).

The specificity of IL-4 δ 2 primers was validated by amplification of IL-4 δ 2 sequence and by no amplification on IL-4 plasmid (Figure 3, A and B). The dissociation curve indicated the presence of a single amplification product (Figure 3C). This was confirmed by the agarose gel (Figure 3D). These primers were validated as IL-4 δ 2 specific and used for quantifications.

Expression of IL-4 and IL-4 δ 2 in activated T lymphocytes

Activated T cells are among others the cells responsible of IL-4 secretion. In this context, we wanted to determine if IL-4 δ 2 is expressed upon T cell stimulation *in vitro* and we wanted to address the IL-4/IL-4 δ 2 ratio. Human CD3+ T cells were purified from blood samples of three healthy donors and were activated during 3 days. Extracted mRNA was analyzed first by RT-PCR. Primers used for this amplification did not discriminate between both variants. The size difference observed on agarose gel distinguished the IL-4 δ 2 variant from IL-4. An

increase of the level of IL-4 and IL-4 δ 2 was observed by RT-PCR analyses (Figure 4) in all donors. This observation needed to be confirmed by a more quantitative method.

After RNA isolation and reverse transcription to cDNA, IL-4 and IL-4 δ 2 mRNA expression levels were measured by qPCR on the same three independent experiments. GUSB (Glucuronidase beta) were chosen as reference genes among 32 (Data not shown). They were selected as they displayed less variability of expression in both human PBMC and T cells. Specific primers were used to measure each variant and expression levels were quantified by normalization on the reference genes GUSB. The expression levels of these mRNAs in healthy donors controls differed significantly (figure 5). For example, IL-4 and IL-4 δ 2 levels increased at 72h for donor 2 whereas for donor 1 and donor 3, the expressions increased at 48h and decreased at 72h. As a general rule, IL-4 δ 2 mRNA level followed IL-4 mRNA level. But, it was noticed that IL-4 δ 2 level was very low and this variant was very few expressed in healthy conditions, even after 3 days of activation. No general correlation was observed between these three donors indicating a high donor-specificity.

Expression of IL-4 and IL-4 δ 2 in several cell types

We showed previously that IL-4 δ 2 is expressed in PBMC and T cells (CD3+). But among these groups of cells we do not exactly know which cell type is able to produce this variant. To bring details in *ex vivo* IL-4 δ 2 expression, different cell types were sorted to analyze the expression of IL-4 and its splice variant. In PBMC, IL-4 and IL-4 δ 2 were amplified by qPCR (Figure 6). But when analyzing CD4+ and CD8+ cells from the same donor, IL-4 δ 2 was not detected. This suggested that helper T cells and cytotoxic T cells were not the main producers of IL-4 δ 2 in the PBMC. Granulocytes are mainly composed of neutrophils, but also of eosinophils and basophils. A non negligible level of IL-4 δ 2 was detected in granulocytes suggesting the presence of IL-4 producing cells such as basophils and eosinophils. This data suggested that IL-4 δ 2 can be expressed by basophils and eosinophils, like IL-4. However, CD4+ and CD8+ cells produced IL-4 without producing its splice variant IL-4 δ 2.

IL-4 δ 2 functionality

Expression of IL-4 δ 2 as a recombinant protein

To produce the two human IL-4 isoforms the first choice of expression system were human cells like the eukaryotic cell line HEK293T. IL-4 and IL-4 δ 2 proteins were not produced 24h after transfection (data not shown), but IL-4 was secreted in supernatant 48h after transfection (figure 7 A and B). The IL-4 protein was detected by Western Blot using an anti-IL-4 and an anti-HisTag. However IL-4 δ 2 was not detected. This absence was not due to a detection issue because the IL-4 antibody was able to recognize this isoform (as shown in figure 9). The parasite *Leishmania tarentolae* is also used as an expression system producing a glycosylation pattern similar to human. IL-4, unlike IL-4 δ 2, was secreted in the culture supernatant (figure 7 C). This findings correlate with the results in human cells. The lack of IL-4 δ 2 production indicates the impossibility of the cell to produce this protein.

RNA is extracted from transfected cells to verify if the IL-4 δ 2 gene transcription took place. PCR using primers amplifying from ATG to stop reveals presence of mRNA of IL-4 and IL-4 δ 2 24h and 48h after transfection (figure 8). Transcription from both plasmids occurred in HEK cells. The translation issue seems probably the most favorable reason for the absence of IL-4 δ 2 protein in eukaryote cells.

Another expression system was tested to express both variants. SHuffle T7 Express Competent *E.coli* bacteria were used because of their specificity to produce well-structured proteins. This BL21 strain, allows the formation of disulfide bonds in the cytoplasm, thanks to the presence of DsbC isomerase. This strain is also deficient in endonuclease I (endAI) and proteases Lon and OmpT. This bacterium seemed optimal for the conformation of IL-4 (3 disulfide bonds) and IL-4 δ 2 (2 disulfide bonds). Expressions were analyzed by Western Blot analyses and both isoforms are different from their size (15.9kDa for IL-4 and 14.2kDa for IL-4 δ 2). SHuffle bacteria produced IL-4 and IL-4 δ 2 recombinant proteins (figure 9). These proteins were mainly produced in insoluble fraction however, their HisTag in C terminal position allowed purification on nickel columns. The nomenclature used is rIL-4 for the commercial recombinant IL-4 protein, IL-4S for the IL-4 protein produced in SHuffle bacteria and IL-4 δ 2S for the protein IL-4 δ 2 produced in SHuffle bacteria.

Proliferation assay

The TF-1 cell line is commonly used to validate the activity of commercial recombinant protein. This cell line is specifically used for IL-4 activity validation because of the presence of both IL-4R α , γ c and IL-13R α 1 constituting the two IL-4 receptors. The functionality of the proteins produced in SHuffle bacteria was consequently validated with a proliferation assay on TF-1 cells using CFSE incorporation. Cells were cultured with increasing concentrations of IL-4S and IL-4 δ 2S. A commercial recombinant rIL-4 and GM-CSF were used as positive controls. The cell proliferation induced by GM-CSF validated our experiment (Figure 10). Cell proliferation is also observed with increasing concentration of rIL-4, from 0.1 to 5 ng/mL. However, IL-4S did not induce cell proliferation until a concentration of 15 ng/mL. The proliferation with IL-4S was observed between 15 and 45ng/mL. These concentrations are larger than the concentration needed for the commercial protein to induce cell proliferation. IL-4 δ 2S did not induce any proliferation even at a concentration of 45 ng/mL. IL-4S had weak activity while IL-4 δ 2S did not induce any proliferation. High cell mortality was observed when TF-1 culture medium was depleted in GM-CSF. The Propidium Iodide study indicated 76% of viability at day 4 for cells cultured with GM-CSF whereas cells treated without activator or with rIL-4, IL-4S and IL-4 δ 2S had a viability inferior to 55% at day 4 (data not shown). Indeed, IL-4 seemed to induce cell proliferation but does not seem to induce cell survival signal sufficiently, even when cells proliferate with 5ng of commercial IL-4.

Induction of the IL-4 δ 2 signaling pathway

Defined as an IL-4 agonist as well as an antagonist, IL-4 δ 2 function is not well determined. For agonistic functions, it is suggested that IL-4 δ 2 induces similar signaling pathways to IL-4. However, for antagonistic functions, different pathways may be involved. Thus, the signaling pathways induced by IL-4 and IL-4 δ 2 were studied on TF-1 cells. Because of the weak activity of SHuffle IL-4 protein, a high concentration was used for this study (200ng/mL). At this concentration, IL-4 was active *in vitro*. IL-4 predominantly induces STAT-6 phosphorylation while binding to IL-4R. However, IL-4 δ 2S was not able to activate STAT-6 phosphorylation (figure 11 A and B). In cells cultured without activator (negative control), phosphorylated STAT-6 was not detected even if a basal level of non phosphorylated STAT-6 is detected. Commercial recombinant IL-4 and IL-4 produced in SHuffle bacteria induced STAT-6 phosphorylation. STAT-6 was not phosphorylated by IL-4 δ 2S in these conditions. If IL-4 δ 2 can induce a signal through IL-4 receptor, effects might be STAT-6-independent. This

observation correlates with the lack of proliferation of TF-1 cells observed in presence of IL-4 δ 2. Another signaling pathway used by IL-4 to prevent cell from apoptosis and to induce cell growth require the phosphorylation of IRS-2 in hematopoietic cells. We hypothesized that IL-4 δ 2 may induce the phosphorylation of IRS-2. As shown in figure 11, non phosphorylated IRS-2 protein was not detected in any condition (figure 11 C and D). There was a basal expression in control condition that was not modified after any of the activation conditions tested. We also investigated the phosphorylation of STAT-5 after IL-4 δ 2S engagement to IL-4 receptor. A basal level of STAT-5 was detected in all conditions, with or without activator. Commercial rIL-4 and IL-4S induced STAT-5 phosphorylation (figure 11 E and F). IL-4 δ 2 did not seem to induce such signal. With this study, we can conclude that IL-4 δ 2 is not able to induce IL-4 signaling pathway following receptor engagement. STAT-6, STAT-5 and IRS-2 are not phosphorylated by IL-4 δ 2 signaling.

DISCUSSION

IL-4 δ 2 is a natural isoform of IL-4 found in several species. However, little is known about the functionality of this variant. With this study, new insights of IL-4 δ 2 expression, functionality and role are brought to improve the comprehension of the immune system.

Working with alternatively spliced variants, it seems essential to make sure of the specificity of the tools used. Indeed, most of splice variants are very similar, at mRNA and protein level, to the full-length molecule. IL-4 δ 2 diverges from full-length IL-4 by only 48bp meaning 16 amino acids. Previous publications used qPCR primers to specifically amplify IL-4 δ 2 but the primer specificity is usually not described in detail^{43,44}. Using discriminatory qPCR primers, expression of IL-4 and its splice variants was studied on activated T cells from healthy donors. Various levels of IL-4 δ 2 and IL-4 mRNAs were observed in the samples. The expression profile of these two cytokines was donor dependent. But to get significant results, this experiment needs to be pursued with more samples of healthy donors. However, this observation corroborates results from Luzina *et al.* on asthmatic patients³⁸. The IL-4 and IL-4 δ 2 mRNA expression levels were not similar from a donor to another. There were no differences indicating a pathological or an activation state. Considering this observations, it is difficult to consider IL-4 δ 2 mRNA level as a biomarker of health or asthma disease. IL-4 δ 2 mRNA was detected in PBMC and T cells but there was no information on the cellular cell type producing the variant. To bring no insights on IL-4 δ 2 expression *in vivo*, mRNA level was measured in several cell types. IL-4 δ 2 was detected in PBMC, but not in CD4+ and CD8+ T cells from the same donor, suggesting the presence of another IL-4 δ 2 producer. Granulocytes were found to produce IL-4 δ 2, maybe because of the presence of basophils and/or eosinophils. From these findings, it will be interesting to extend the investigation to other cell types such as NK, NKT, $\gamma\delta$ T cells or monocytes. We can suggest that IL-4 δ 2 present in PBMC was not mainly produced by the major producer of IL-4, CD4+ T cells.

Luzina *et al.* recently isolated the first IL-4 δ 2 protein *ex vivo* in asthmatic patients³⁸. If this protein is produced in pathological states, we wonder which can be its functionality. To conduct this study, recombinant proteins were produced. But, we faced difficulties to produce recombinant IL-4 δ 2 protein. Only SHuffle bacteria were able to express this protein. An interesting finding was the non production of IL-4 δ 2 isoform by HEK293T and *Leishmania tarentolae* system while IL-4 is expressed. Several hypotheses could explain this absence of

production: a transcription issue, a problem of mRNA stability, a misfolding of the protein or a toxicity of the IL-4 δ 2 protein. The last proposal was unlikely since no increase in cell mortality was found compared to IL-4 production. An issue in the mRNA stability seemed not to be the reasons of the absence of the translation, because IL-4 δ 2 mRNA were extracted and detected by RT-PCR. Thus, this absence of expression might be indicative of a problem during translation of the mRNA or a rapid degradation of the protein produced. This favored the fact that IL-4 δ 2 protein was detected in asthmatic patients and not in healthy donors³⁸. A pathological state can induce an abnormal regulation of transcription and translation. The question of its potential secretion *in vivo* will determine its implications on abnormal situations and pathologies.

Produced in SHuffle bacterias, IL-4 and IL-4 δ 2 proteins purified and used for functional studies. Proteins were expressed in the cytoplasm fraction of the bacteria. The pelB sequence was normally cleaved during protein exportation from cytoplasm to periplasm. In our case, pelB may not be cleaved because of its absence of translocation in the periplasm. However, in the IL-4 secondary structure, the N and C terminal of the protein are close together and far from the active site. The pelB sequence may not be an issue for protein functionality.

Because of the use of a bacterial expression system the recombinant proteins were non-glycosylated. However, currently, commercially available IL-4 proteins are produced in *E. coli* and functionally active. In our experiment, a high level of LPS was co-purified. However TF-1 cells used for proliferation and receptor activation tests does not express CD14 on their surface, marker necessary to interact with toll-like receptor-4 (TLR-4) to facilitate endotoxins signaling⁴⁰.

The recombinant protein functionality was validated using a CFSE test. The recombinant IL-4 produced in SHuffle bacteria was not as functional as a commercial recombinant protein. The low activity of IL-4 protein can be explained by an under-estimated concentration of our proteins. The concentration was determined by Western Blot, to avoid the dosage of potential contaminant proteins such as LPS. Protein concentration was quantified by comparison to a range of the commercial protein, which was anticipated to be the most accurate method to make quantifications corresponding. This hypothesis may not explain this weak activity. However, another explanation can be related to the folding of the protein. Protein produced in SHuffle bacteria should have disulfide bridges formed and the protein may be folded. But during purification and with the use of urea, the structure of the protein might be affected. After purification and dialysis, the protein might not be correctly refolded. A circular dichroism analysis should indicate the structure composition of the recombinant protein. A proliferation assay realized with non purified recombinant protein should also be a method to clarify the consequences of purification on the protein conformation and activity. In this test, IL-4 δ 2 could not induce cell proliferation suggesting that IL-4 δ 2 was may not able to induce this signal through the engagement to the IL-4 receptor.

Considering the potential expression of IL-4 δ 2 protein *in vivo*, a study on signaling pathway was conducted. With this study, we showed that IL-4 δ 2 seemed unable to induce IL-4 pathways. IL-4 δ 2 did not induce STAT-6 phosphorylation while IL-4 does. Phosphorylated and dimerized STAT-6 binds to specific genes in order to induce T cell proliferation and differentiation⁴¹. STAT-6 acts for IgE production, CD23 expression and CMH class II presentation by B cells⁴². We can conclude that IL-4 δ 2 was not able to induce Th2 phenotype. IRS-2, leading to anti-apoptosis signals through activation of PI3K/AKT or to cell growth signal through activation of Grb2, Ras, Mek and Erk, was studied as a potential signaling pathway induced by IL-4 δ 2. But IL-4 δ 2 did not seem to induce such signals. STAT-5, also phosphorylated following IL-4 signaling, was not phosphorylated by IL-4 δ 2 either. In contrast

to IL-4, IL-4 δ 2 could not induce STAT-6, IRS-2 and STAT-5 phosphorylation suggesting an absence of signal while engaging the receptor. We can imagine that alternative pathways may be used by IL-4 δ 2, or that IL-4 δ 2 played only a role of IL-4 antagonist by competition for binding the receptor.

The reality of the protein secretion *in vivo* was demonstrated once in an asthma context and we can envisage a production of such protein in abnormal situations such as pathological state when the regulation of its expression can be hedged. Even if IL-4 δ 2 protein is produced, the relative regulation of IL-4 and IL-4 δ 2 is still unknown.

With the new highlight on intracellular signaling, IL-4 δ 2 can even more be considered as a Th1 cytokine. IL-4 δ 2 may not induce Th1 signaling pathways, but inhibit Th2 phenotype. As a new cytokine, IL-4 δ 2 should be taken in consideration when studying the immune response.

Allergy, asthma are Th2 driven diseases affecting the worldwide population. With the knowledge on IL-4 δ 2 it seems essential now to develop tools and therapies that consider IL-4 δ 2 as a cytokine full-fledged. We can envisage that, by its possibility to slow down IL-4 effects, IL-4 δ 2 impacts the inflammatory state and if IL-4 δ 2 expression is not induced, IL-4 may not be regulated and the immune response can be transformed in a chronic inflammation.

In summary, IL-4 δ 2 is not able to induce signaling pathways through IL-4 receptor. Its functionality seems to be a competition inhibition of the IL-4 binding to IL-4R α . However further studies on IL-4 δ 2 are necessary to understand its expression and to use it as a biomarker in pathological states as asthma.

BIBLIOGRAPHIE

1. Howard, M. *et al.* Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.* **155**, 914–923 (1982).
2. Yokota, T. *et al.* Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5894–5898 (1986).
3. Howard, M. & Paul, W. E. Interleukins for B lymphocytes. *Lymphokine Res.* **1**, 1–4 (1982).
4. Brown, M. A. *et al.* B cell stimulatory factor-1/interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell* **50**, 809–818 (1987).
5. MacGlashan, D., Jr *et al.* Secretion of IL-4 from human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J. Immunol.* **152**, 3006–3016 (1994).
6. Seder, R. A. *et al.* Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 2835–2839 (1991).
7. Gessner, A., Mohrs, K. & Mohrs, M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J. Immunol.* **174**, 1063–1072 (2005).
8. Fernandez-Botran, R. *et al.* Interleukin 4 mediates autocrine growth of helper T cells after antigenic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9689–9693 (1986).
9. Romagnani, S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol. Today* **12**, 256–257 (1991).
10. Kuperman, D. A. & Schleimer, R. P. Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Curr. Mol. Med.* **8**, 384–392 (2008).
11. Mitchell, L. C., Davis, L. S. & Lipsky, P. E. Promotion of human T lymphocyte proliferation by IL-4. *J. Immunol.* **142**, 1548–1557 (1989).
12. Severinson, E. *et al.* Interleukin 4 (IgG1 induction factor): a multifunctional lymphokine acting also on T cells. *Eur. J. Immunol.* **17**, 67–72 (1987).
13. LaPorte, S. L. *et al.* Molecular and Structural Basis of Cytokine Receptor Pleiotropy in the Interleukin-4/13 System. *Cell* **132**, 259–272 (2008).
14. Shields, J. G., Armitage, R. J., Jamieson, B. N., Beverley, P. C. & Callard, R. E. Increased expression of surface IgM but not IgD or IgG on human B cells in response to IL-4. *Immunology* **66**, 224–227 (1989).
15. Rousset, F. *et al.* Regulation of Fc receptor for IgE (CD23) and class II MHC antigen expression on Burkitt's lymphoma cell lines by human IL-4 and IFN-gamma. *J. Immunol.* **140**, 2625–2632 (1988).
16. Defrance, T. *et al.* Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **165**, 1459–1467 (1987).
17. Steinke, J. W. Anti-interleukin-4 therapy. *Immunol Allergy Clin North Am* **24**, 599–614, vi (2004).
18. Demissie, A. *et al.* Healthy individuals that control a latent infection with Mycobacterium tuberculosis express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. *J. Immunol.* **172**, 6938–6943 (2004).
19. Chen, F. *et al.* An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat. Med.* **18**, 260–266 (2012).
20. Zaretsky, A. G. *et al.* T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med* **206**, 991–999 (2009).

21. Jakubzick, C., Kunkel, S. L., Puri, R. K. & Hogaboam, C. M. Therapeutic targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis. *Immunol. Res.* **30**, 339–349 (2004).
22. Paul, W. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* **77**, 1859 – 1870 (1991).
23. Zav'yalov, V. P. *et al.* Molecular model of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4 δ 2, a naturally occurring inhibitor of IL-4-stimulated T cell proliferation. *Immunology Letters* **58**, 149–152 (1997).
24. Russell, S. M. *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* **262**, 1880–1883 (1993).
25. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J. & Paul, W. E. THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annual Review of Immunology* **17**, 701–738 (1999).
26. Sorg, R. V., Enczmann, J., Sorg, U. R., Schneider, E. M. & Wernet, P. Identification of an alternatively spliced transcript of human interleukin-4 lacking the sequence encoded by exon 2. *Exp. Hematol.* **21**, 560–563 (1993).
27. Alms, W. J., Atamas, S. P., Yurovsky, V. V. & White, B. Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing. *Molecular Immunology* **33**, 361–370 (1996).
28. Vasiliev, A. M. *et al.* Structural and functional properties of IL-4 δ 2, an alternative splice variant of human IL-4. *J. Proteome Res.* **2**, 273–281 (2003).
29. Atamas, S., Choi, J., Yurovsky, V. & White, B. An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 δ 2, inhibits IL- 4-stimulated T cell proliferation. *The Journal of Immunology* **156**, 435 –441 (1996).
30. Gautherot, I., Burdin, N., Seguin, D., Aujame, L. & Sodoyer, R. Cloning of interleukin-4 δ 2 splice variant (IL-4 δ 2) in chimpanzee and cynomolgus macaque: phylogenetic analysis of δ 2 splice variant appearance, and implications for the study of IL-4-driven immune processes. *Immunogenetics* **54**, 635–644 (2002).
31. Yuan, Z. *et al.* Tuberculosis-Induced Variant IL-4 mRNA Encodes a Cytokine Functioning As Growth Factor for (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl Pyrophosphate-Specific V γ 2V δ 2 T Cells. *The Journal of Immunology* **182**, 811 –819 (2009).
32. Perkins, H. D., van Leeuwen, B. H., Hardy, C. M. & Kerr, P. J. THE COMPLETE cDNA SEQUENCES OF IL-2, IL-4, IL-6 AND IL-10 FROM THE EUROPEAN RABBIT (ORYCTOLAGUS CUNICULUS). *Cytokine* **12**, 555–565 (2000).
33. Yatsenko, O. P. *et al.* Alternative splicing of mRNA of mouse interleukin-4 and interleukin-6. *Cytokine* **28**, 190–196
34. Rhodes, S. G. *et al.* Is Interleukin-4 δ 3 Splice Variant Expression in Bovine Tuberculosis a Marker of Protective Immunity? *Infect Immun* **75**, 3006–3013 (2007).
35. Tsytsikov, V. N., Yurovsky, V. V., Atamas, S. P., Alms, W. J. & White, B. Identification and Characterization of Two Alternative Splice Variants of Human Interleukin-2. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23055 –23060 (1996).
36. Arinobu, Y. *et al.* Antagonistic Effects of an Alternative Splice Variant of Human IL-4, IL-4 δ 2, on IL-4 Activities in Human Monocytes and B Cells. *Cellular Immunology* **191**, 161–167 (1999).
37. Luzina, I. G. *et al.* Splice isoforms of human interleukin-4 are functionally active in mice in vivo. *Immunology* **132**, 385–393 (2011).
38. Luzina, I. G. *et al.* Natural production and functional effects of alternatively spliced interleukin-4 protein in asthma. *Cytokine* (2012).doi:10.1016/j.cyto.2011.12.017
39. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611–622 (2009).
40. Alexaki, A. *et al.* PMA-induced differentiation of a bone marrow progenitor cell line activates HIV-1 LTR-driven transcription. *DNA Cell Biol.* **26**, 387–394 (2007).

41. Paul, W. E. Interleukin 4: signalling mechanisms and control of T cell differentiation. *Ciba Found. Symp.* **204**, 208–216; discussion 216–219 (1997).
42. Chomarat, P. & Banchereau, J. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur. Cytokine Netw.* **8**, 333–344 (1997).
43. Seah, G. . & Rook, G. A. . A sensitive, non-radioactive quantitative method for measuring IL-4 and IL-4 δ 2 mRNA in unstimulated cells from multiple clinical samples, using nested RT-PCR. *Journal of Immunological Methods* **228**, 139–149 (1999).
44. Plante, S. *et al.* Mast cells regulate procollagen I (alpha 1) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/IL-4 delta 2 ratio. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 1321–1327 (2006).

TABLES

Table 1: Primers used for PCR amplification

EEF1G f	5' gctcacetgceccaagagtacc 3'
EEF1G r	5' gaccagccgctccttatcaaagtc 3'
IL-4 ATG f	5' atgggtctcacctccaactgctt 3'
IL-4 STOP r	5' tcagctcgaacactttgaatattc 3'

Table 2: qPCR primers

IL-4 (128bp)		
	fIL-4 exon2	5' TGTGCACCGAGTTGACCGTAAC 3'
	rIL-4 exon3	5' GCAGCGAGTGTCTTCTCATGG 3'
IL-4d2 (99bp)		
	fIL-4d2 exon1	5' GGCAACTTTGTCCACGGACAC 3'
	rIL4d2 exon1-3	5' TTCCTTCTCAGTTGTGTTCTTC 3'
ELF1 (155bp)		
	fELF1	5' TGTCCAACAGAACGACCTAGT 3'
	rELF1	5' CTTCACACAGGCTAGACCG 3'
GUSB (125bp)		
	fGUSB	5' GAGGCCGACATCAGCAACC 3'
	rGUSB	5' TCAGTCAGGTATTGGATGGTCC 3'

FIGURES

Figure 1: qPCR primers location on IL-4 and IL-4 δ 2 sequences

IL-4 is composed of 4 exons and IL-4 δ 2 is deleted of exon 2. IL-4 specific primers are located on exon 2 and exon 3. IL-4 δ 2 specific primers are located on exon 1 and on the exon 1 and exon 3 junction with 4 bases overlapping in exon 1.

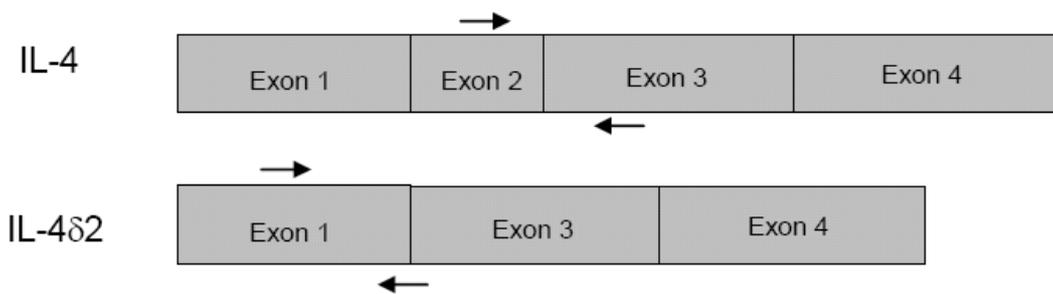


Figure 2: Amplification with IL-4 specific primers on IL-4 and IL-4 δ 2 sequences and corresponding agarose gel electrophoresis.

A: qPCR amplification with IL-4 specific primers on IL-4 plasmid. B : lack of amplification of IL-4 specific primers on IL-4 δ 2 plasmid. C : Dissociation curve corresponding to specific IL-4 amplification. D : load on agarose gel of IL-4 specific amplification, the fragment size waited is 128bp. 1: No Template Control (NTC); 2: amplification on IL-4 plasmid; 3: amplification on IL-4 δ 2 plasmid.

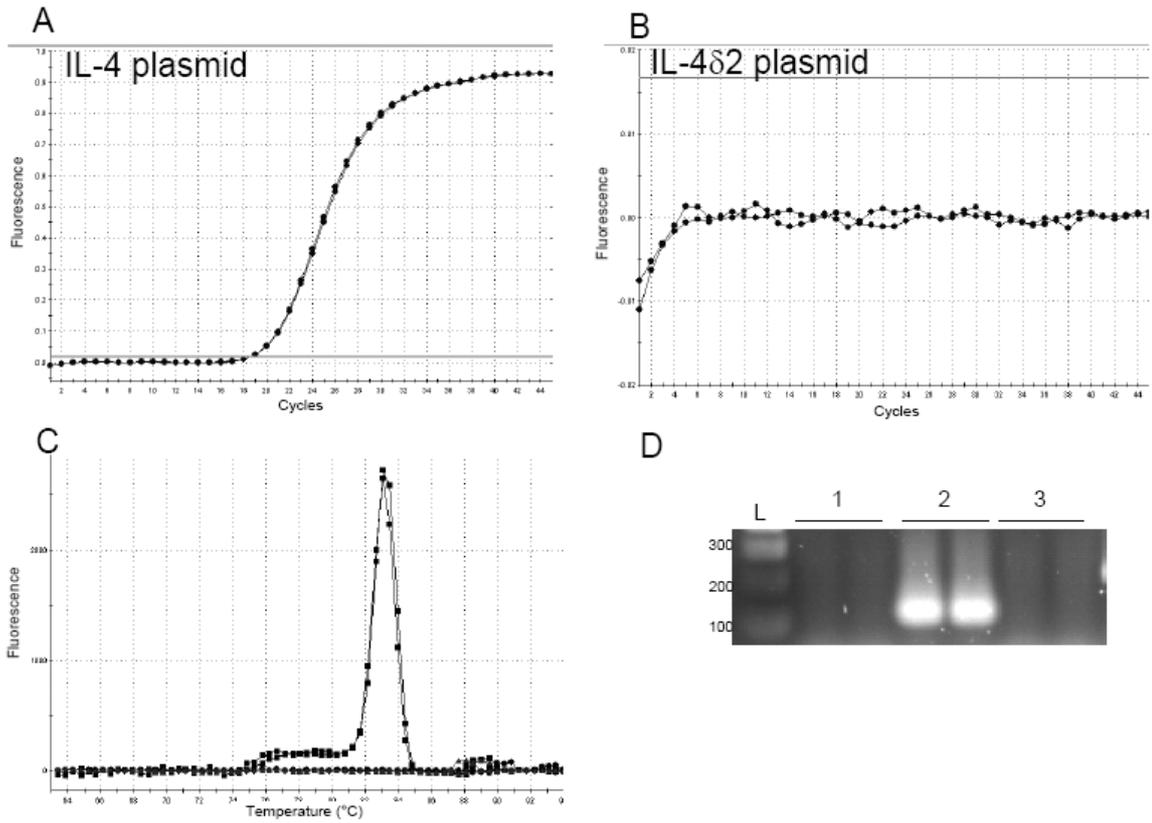


Figure 3: Amplification with IL-4 δ 2 specific primers on IL-4 and IL-4 δ 2 sequences and corresponding agarose gel.

A: Lack of amplification with IL-4 δ 2 specific primers on IL-4 plasmid. B: qPCR amplification with IL-4 δ 2 specific primers on IL-4 δ 2 plasmid. C: Dissociation curve corresponding to specific IL-4 δ 2 amplification. D: load on agarose gel of IL-4 δ 2 specific amplification, the fragment size waited is 99bp. 1: No Template Control (NTC); 2: amplification on IL-4 plasmid; 3: amplification on IL-4 δ 2 plasmid.

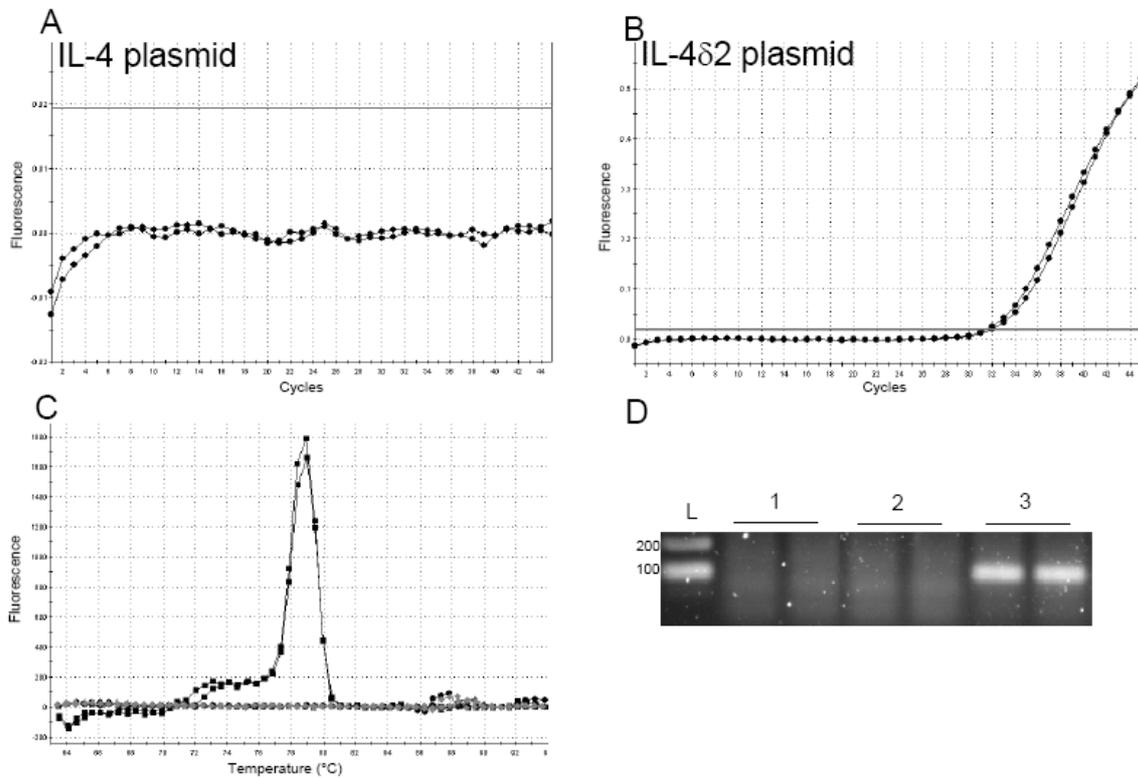


Figure 4: PCR amplification of IL-4 variants from activated T cells from several donors. Analysis is realized 0, 24h, 48h and 72 after activation with 3 different donors. L: ladder

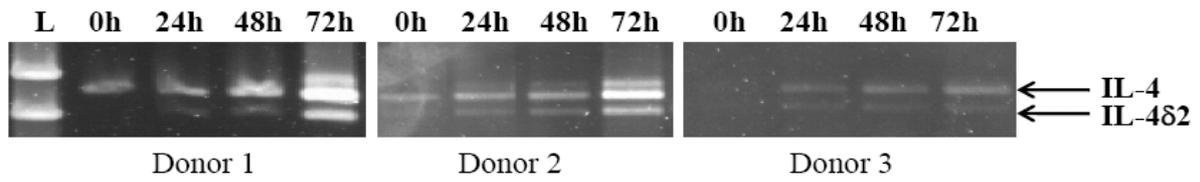


Figure 5: qPCR quantification of IL-4 (Black) and IL-4 δ 2 (Grey) mRNA from activated T cells of 3 healthy donors. IL-4 δ 2 and IL-4 are normalized on GUSB reference gene.

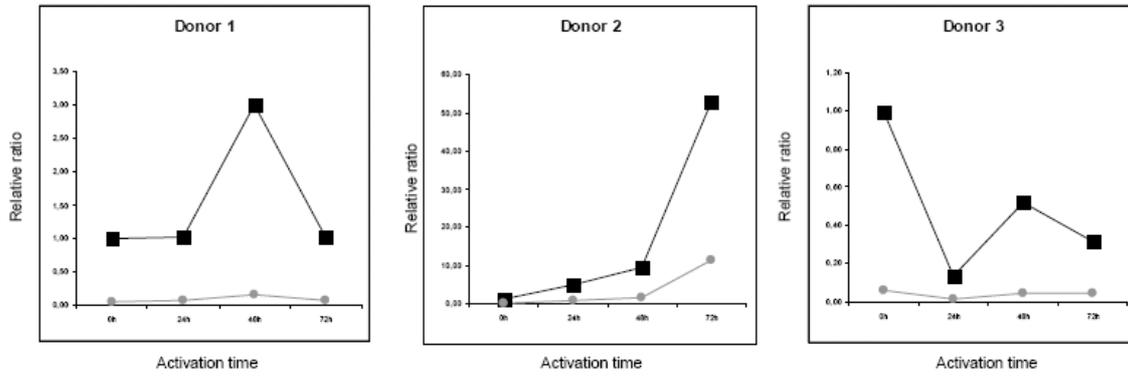


Figure 6: IL-4 and IL-4 δ 2 mRNA expression in several cell types
qPCR quantification of IL-4 and IL-4 δ 2 in A: PBMC, B: CD8+ cells, C: CD4+ cells and D: Granulocytes.

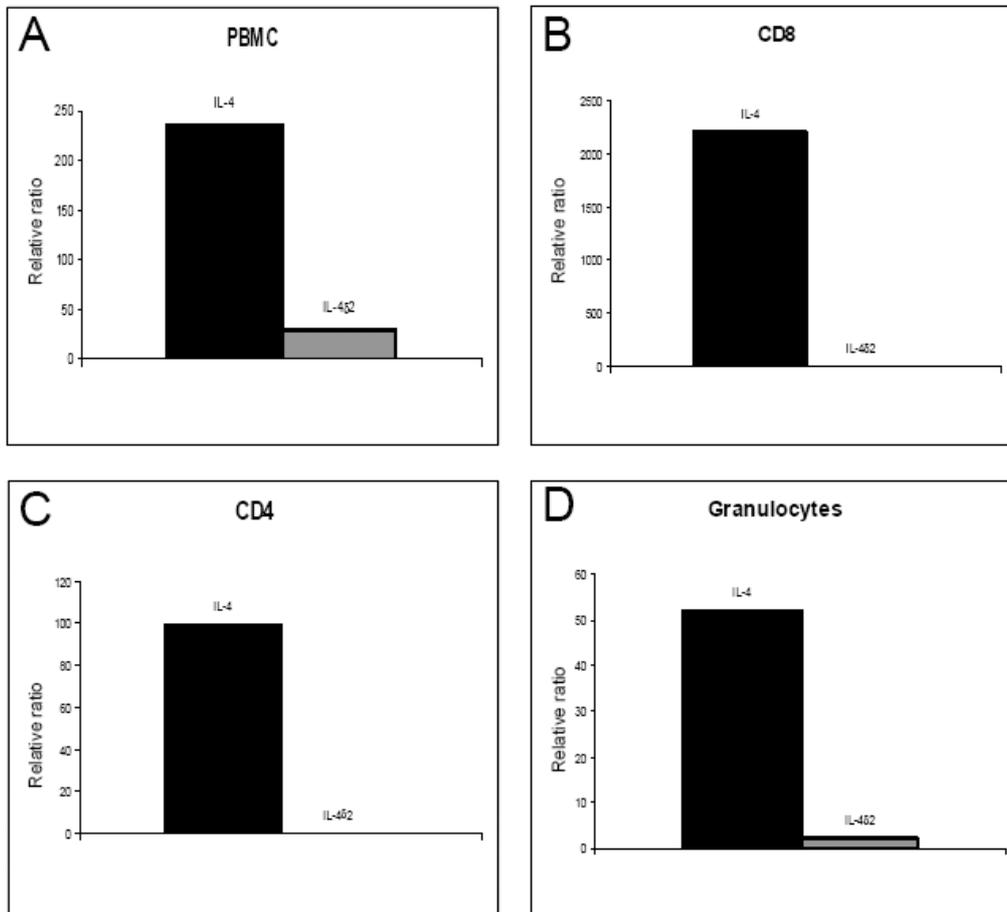


Figure 7: IL-4 and IL-4 δ 2 protein expression in HEK293T cells and *Leishmania tarentolae*

*A: western blot of 4x concentrated supernatant of HEK293T cells revealed by anti-human IL-4, B: western blot of 4x concentrated supernatant of HEK293T cells revealed by anti-HisTag, C: Western blot of 30x concentrated supernatant of *Leishmania tarentolae* revealed by anti-human IL-4. L: ladder, 1: IL-4 clone 1, 2: IL-4 clone 2, 3: Mock, 4: IL-4 δ 2 clone 1, 5: IL-4 δ 2 clone 2, 6: rIL-4, 7: IL-4 non induced, 8: IL-4 induced, 9: IL-4 δ 2 non induced, 10: IL-4 δ 2 induced*

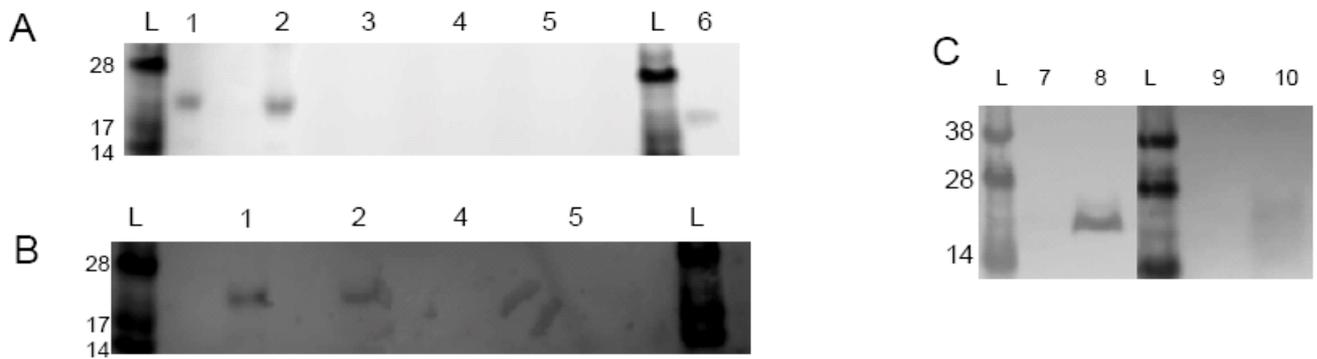


Figure 8: Amplification of IL-4 and IL-4 δ 2 mRNA extracted from transfected HEK293T cells

L: ladder, 1: mRNA from cells collected 24h after transfection with IL-4 plasmid, 2: mRNA from cells collected 24h after transfection with IL-4 δ 2 plasmid, 3: mRNA from cells collected 48h after transfection with IL-4 plasmid, 4: mRNA from cells collected 48h after transfection with IL-4 δ 2 plasmid, 5: negative control of PCR, 6: positive control of PCR.

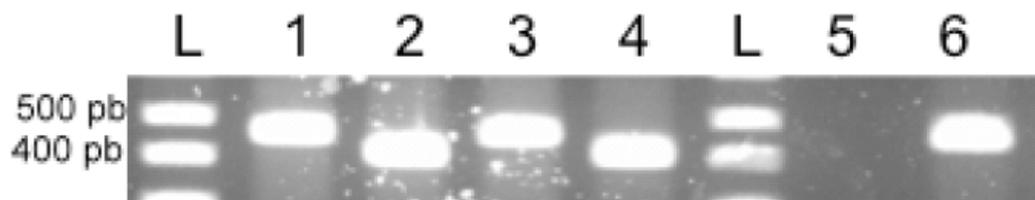


Figure 9: IL-4 and IL-4 δ 2 production by SHuffle bacteria

IL-4(15.9kDa) and IL-4 δ 2 (14.2kDa) are both produced by SHuffle bacteria in insoluble fraction. Not induced cells, IL-4 plasmid transfected cells and IL-4 δ 2 transfected cells were collected 4 hours after induction. T: total fraction, i: insoluble fraction, s: soluble fraction A: Western blot is revealed with anti-HisTag antibody B: Western blot is revealed with anti-human IL-4.

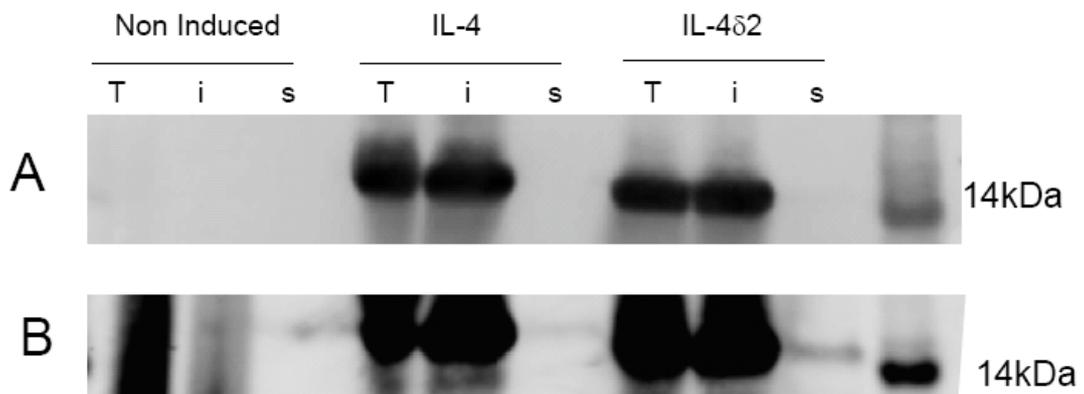


Figure 10: Effects of IL-4 and IL-4 δ 2 on TF-1 cells proliferation.

Study of cell proliferation induced by commercial IL-4 (rIL-4) at 0.1, 1 and 5 ng/mL, IL-4 and IL-4 δ 2 produced in SHuffle bacteria, at 5, 15 and 45ng/mL. Proliferation is evaluated by the cell number that proliferates between viable cells.

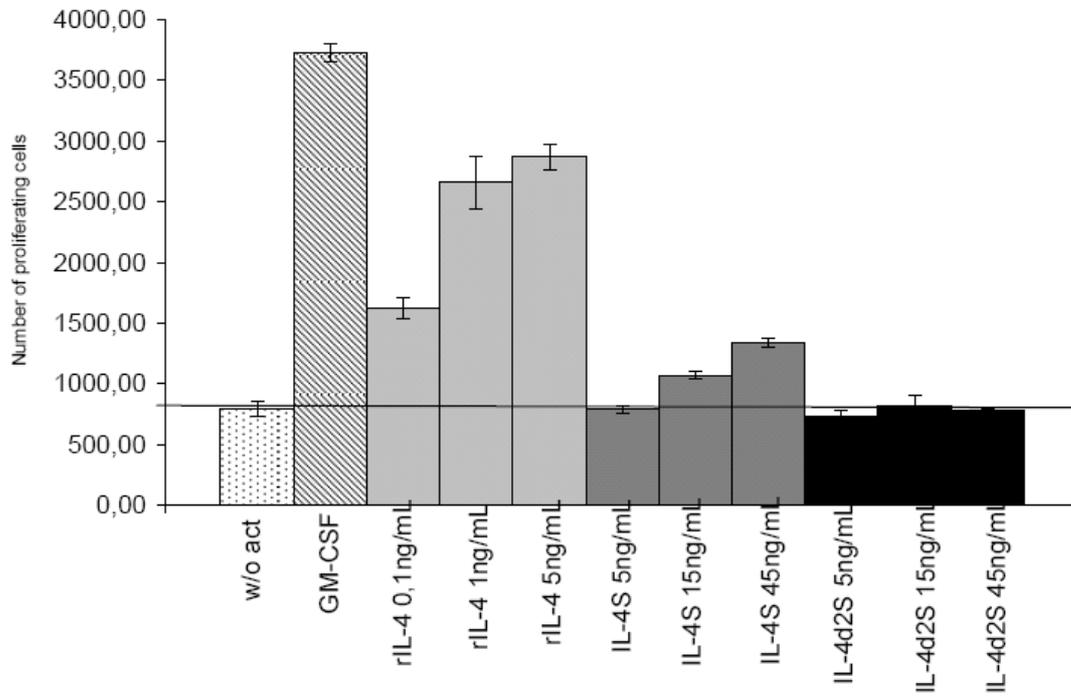
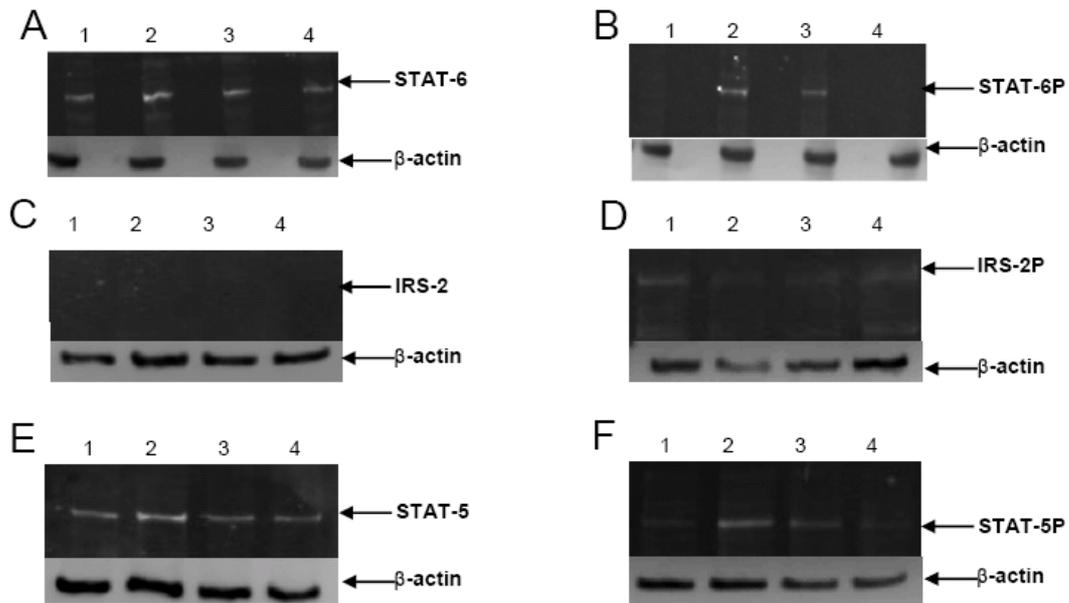


Figure 11: Detection of signaling pathways activation by IL-4 and IL-4 δ 2

β -actin is a positive control for Western Blot analysis. A: Western-Blot revealing STAT-6. B: Western-Blot revealing phosphorylated STAT-6. C: Western-Blot revealing IRS-2. D: Western-Blot revealing phosphorylated IRS-2. E: Western-Blot revealing STAT-5. F: Western Blot revealing phosphorylated STAT-5.

1: cells without activator, 2: cells activated with commercial recombinant IL-4, 3: cells activated with IL-4 produced in *SHuffle* bacteria, 4: cells activated with IL-4 δ 2 produced in *SHuffle* bacteria.



PARTIE II

Discovery of a new alternative splice variant of Human Interleukin-4 and study of its functionality as nonsense-mediated decay

Hauvespre C., Morretton J.P., Arnaud-Barbe N., De Luca K., Auboeuf D., Legras Lachuer C., Sodoyer R., Courtois V.

Article en préparation

Au cours de l'étude de l'expression de l'IL-4 δ 2 dans des échantillons humains, trois nouveaux variants de l'IL-4 ont été clonés et séquencés. Ainsi, l'IL-4v1 avec une rétention d'une partie de l'intron 1, l'IL-4v2, avec une rétention de l'intron 2, et l'IL-4v3 avec une rétention de deux parties de l'intron 3 ont été découverts. L'un d'entre eux a particulièrement attiré notre attention : l'IL-4v2 qui possède une rétention de 101 nucléotides de l'intron 2. L'analyse de sa séquence a montré que tous les sites d'épissage requis sont présents, considérant ainsi cette partie d'intron 2 comme un nouvel exon. L'étude de la force des sites d'épissage a renforcé cette hypothèse. La traduction de ce nouveau variant conduit à l'utilisation d'un codon stop prématuré situé, 50 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon. Ceci est caractéristique d'un ARNm soumis au processus NMD. Ainsi le processus NMD dégrade des ARN messagers lors de la première traduction de celui-ci. Cette hypothèse a été vérifiée par un test à la cycloheximide, prouvant la dégradation de l'ARN correspondant. L'utilisation du procédé NMD permet de réguler l'expression du gène de l'IL-4. Il s'agit de la première démonstration de l'utilisation d'une telle régulation dans le cas de cytokines. Ce nouveau variant caractérisé par une fonction NMD, apporte un nouveau niveau de régulation de l'expression de l'IL-4.

Pour compléter cette étude, une analyse bioinformatique a été réalisée afin de déterminer si ce mécanisme de régulation est conservé entre différentes espèces. Ainsi les primates pourraient potentiellement produire ce variant, car le nouvel exon est très bien conservé. Ainsi le mécanisme NMD associé à l'IL-4v2 pourrait permettre la régulation de l'IL-4 chez les primates. Une moins bonne conservation au niveau de ce nouvel exon est observée pour d'autres espèces indiquant que ces espèces ne semblent pas capables de produire ce variant. Il n'est pour autant pas à exclure qu'elles puissent produire un variant différent également soumis au NMD.

Discovery of a new alternative splice variant of Human Interleukin-4 and study of its functionality as nonsense-mediated decay

Hauvespre C.¹, Morretton J.P.¹, Arnaud-Barbe N.¹, De Luca K.¹, Auboeuf D.², Legras Lachuer C.³, Sodoyer R.^{1*}, Courtois V.^{1*}

1- Sanofi Pasteur, Marcy l'Etoile, France

2- Inserm U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université de Lyon, 69008 Lyon, France

3- ProfileXpert-LCMT, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Lyon, France

*denotes authors co-directed the project equally

Corresponding author: Sodoyer Régis, regis.sodoyer@sanofipasteur.com, tel +33 437 373 226

KeyWords

Interleukin-4, alternative splicing, nonsense-mediated decay, gene regulation

Abstract

Interleukin-4 (IL-4) is a pleiotropic cytokine, regulator of immunity in health and disease progression stages. This cytokine is responsible for the Th2 response during infections with parasites, allergy or asthma. Conducting experiments on human T cells allowed the isolation of a new alternatively spliced variant of IL-4 that was cloned and sequenced. This new, non-previously reported variant, contains a 101 base-pair (bp) retention from the second intron of the *Il4* gene. This new exon generates a shift in the open reading frame creating a premature stop codon (PTC) in the third exon. This PTC is located 50 nucleotides, upstream the junction between exons 3 and 4, the last exon-exon junction, being a characteristic feature of a nonsense-mediated decay (NMD) construct. This new variant might be involved in the regulation of *Il4* gene expression. A bioinformatics extensive analysis has confirmed that this new exon is also present in primates suggesting its conservation during recent evolution. This discovery brings novel information in the regulation of IL-4 expression.

Introduction

Interleukin-4 (IL-4) is a pleiotropic cytokine regulator of immunity, mainly secreted by activated T cells (CD4+) (Howard et al. 1982; Howard and Paul 1982), mast cells (Brown et al. 1987) and basophils (MacGlashan et al. 1994; Seder et al. 1991). This cytokine is an important mediator of immune responses, inducing the Th2 phenotype (Mosmann et al. 1986; Romagnani 1991) and also plays an important role on B cells affecting the allergic response. IL-4 is known to induce the immunoglobulin class switch, in the B-cells subset expressing IgM, into IgG4 and IgE (Shields et al. 1989), the up-regulation of the expression of CD23 on mast cells and B cells, and the increase of the expression of MHC class II molecules (Rousset et al. 1988) and their proliferation as well as the expression of IL-4R at their surface (Defrance et al. 1987).

IL-4 plays additional roles in other cells, like in mast cells where IL-4 promotes growth in association with IL-3 (Mosmann et al. 1986). IL-4 downregulates proinflammatory Th1 responses by inhibiting macrophage activation and production of Th1 cytokines like IL-1, TNF- α , and IFN- γ (Essner et al. 1989). But the macrophages are also activated by IL-4 to increase MHC class II expression and binding of IgG immune complexes. IL-4 also acts on fibroblasts inducing their proliferation and chemotaxis (Postlethwaite and Seyer 1991). Like other Th2 cytokines, IL-4 is involved in the induction of tolerance towards the graft upon organ transplantation (Bijlsma et al. 2002). According to its broad spectrum of functions, IL-4 is involved in various diseases, such as allergy (Steinke 2004), asthma (Kuperman and Schleimer 2008), tuberculosis (Demissie et al. 2004), parasitic infections (Chen et al. 2012; Zaretsky et al. 2009) and pulmonary fibrosis (Jakubzick et al. 2004).

The human *IL4* gene, located on the 5th chromosome is composed of 4 exons and encodes a 15kDa protein. Alternatively spliced transcripts of IL-4 have been detected in humans (Sorg et al. 1993), chimpanzee (Gautherot et al. 2002), cynomolgus (Gautherot et al. 2002; Yuan et al. 2009), rabbit (Perkins et al. 2000), mouse (Yatsenko et al.) and cattle (Rhodes et al. 2007). One of them, isolated in humans, is so-called IL-4 δ 2 and corresponds to the absence of exon 2 (corresponding to amino acids 22 to 37). This variant seems to have IL-4 antagonist activities (Arinobu et al. 1999; Atamas et al. 1996; Luzina et al. 2012). For others alternatively spliced variants, functions are not always well known. A particular attention to alternatively spliced variants needs to be taken at the level of the mRNA detection to better characterize pathways involving the proteins encoded by these variants given that some can have antagonist functions to the native protein (Denesyuk et al. 1998; Tsytsikov et al. 1996).

Some alternatively spliced variants can contain a premature termination codon (PTC) in the sequence. This PTC may give rise to particular transcripts that can be translated into truncated proteins toxic for the producing cell. To engage protection from such transcripts, the cell use a degradation mechanism called the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) process. This process is used by eukaryotic cell as a quality control to protect its integrity and regulate gene expression. NMD can be activated when the PTC, located around 50-55 nucleotides upstream the last exon-exon junction, interacts with an exon-junction complex (EJC), marking each exon junction during splicing. These EJCs located 20-24nt upstream each exon-exon junction (Gardner 2010; Maquat 2004) is still present on the mRNAs during their exportation to the cytoplasm. During the first round of translation, when a premature stop codon is followed by an EJC, the eukaryotic release factors eRF1 and eRF3 bind to the PTC and recruit UPF1. UPF1 then binds to UPF2/UPF3, proteins in the EJC (Kashima et al. 2006; Maquat et al. 2010). This is a crucial step for the NMD activation process. NMD is a post-transcriptional control used not only as a protective process for the cell integrity but also for the regulation of gene expression. Around one third of alternatively spliced variants contain PTCs, suggesting that, coupled to alternative splicing, the NMD is a process regulating gene expression at the post-translational level. RUST (regulated unproductive splicing and translation) is a model established, in which the degradation of non-translating splice variant containing PTCs modulate the regulation of protein expression (Lewis et al. 2003).

In the present work, we describe a new alternatively spliced variant of IL-4 and investigate the expression of this new transcript. Using a NMD inhibition approach by cycloheximide CHX, we have shown *in vitro* that this new transcript might be targeted by NMD degradation. This specific regulation pathway of IL-4 is likely to be conserved during evolution as bioinformatics study suggests, with the presence of this new exon sequence among several species.

MATERIEL AND METHODS

Cell culture

PBMC were extracted from blood of healthy donors using ficoll. T cells were isolated using CD3⁺ microbeads (Miltenyi) according to manufacturer's instructions. T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 (BD Pharmingen) for 3 to 4 days in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum at 37°C, 5% CO₂. HEK293T cells were purchased from ATCC (n°CRL-11268 ATCC). HEK293T cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin (GIBCO). Cells were cultured at 37°C, 5% CO₂.

RNA extraction and analysis

Total RNA was extracted from cells with Ribopure (Ambion) and treated with Turbo DNA-Free (Ambion) according to the manufacturer's instructions. One µg of DNase-treated RNA was used for first-strand cDNA synthesis using random hexamer primer and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) following manufacturer's instructions.

PCR

PCR amplification of IL-4 transcripts was performed using Go Taq (Promega). Primers are listed in table 1 (IL4f/IL4r). Conditions for PCR with AccuPrime Taq (Invitrogen) were 2 minutes at 94°C; followed by 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 15 seconds at 58°C and 30 seconds at 72°C; and a final 7 minutes at 72°C. PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis.

In each RT-PCR, EEF1G (primers listed in table 1) was used as positive control of the RT-PCR (annealing at 60°C, 35 cycles).

For plasmid construction, PCR was realized with Accuprime Taq (Invitrogen) with primers adding needed restriction sites to the sequence (IL4KpnI/IL4XhoI). Conditions for PCR were 2 minutes at 94°C; followed by 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 15 seconds at 58°C and 30 seconds at 68°C.

For NMD detection, IL-4 variants were amplified with Go Taq (Promega) using the primers (IL-4f/IL-4r) with an hybridization temperature of 60°C and 25 cycles. As positive control of NMD, SC35 is amplified as described by Barbier *et al.* (Barbier et al. 2007) with an hybridization temperature of 64°C over 30 cycles.

PCR amplification products were quantified using the Bioanalyzer with DNA 1000 chip (Agilent).

Plasmid constructs

The fragments amplified by PCR were cloned into the pGEM-T easy cloning vector (Promega), allowing blue/white screening of recombinant colonies. The selected recombinant plasmids were then sequenced with the capillary sequencer Applied 3500.

Amplification of the IL-4v2 variant was realized on the clone of pGEM-T product sequenced with primers bringing a kozak sequence and restrictions sites for the cloning. The pcDNA3.1 plasmid was digested and purified with GenElute gel extraction kit (Sigma). The PCR product was digested and purified using Qiaquick PCR purification kit (Qiagen). Plasmid and PCR product were ligated, selected and sequenced with the capillary sequencer Applied 3500.

The same construction was realized for IL-4 from PBMC of another donor.

NMD inhibition by Cycloheximide (CHX)

T cells were activated 24h, 48h, 72h and 96h before being incubated 3 hours with 100µg/mL of cycloheximide (CHX). RNA was extracted as described previously.

Twenty-four hours prior transfection, $5 \cdot 10^5$ cells per well were seeded on a six-well plate. Cells were transfected with 1µg of DNA using Xtremegene DNA 6 transfectant (Roche). As a control for transfection efficiency, 1µg of plasmid GFP (Lonza) were transfected and analyzed by flow cytometry. Twenty-four hours after transfection, a treatment with or without 100 µg/mL of Cycloheximide (CHX) is applied during 4h.

Computational predictions

The MaxEntScan splice site prediction is available at http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html. The method used is based on the maximum entropy principle and assigns a score to the 5' splice site (a 9-mer sequence with 3 bases in the exon and 6 bases in the intron) and to the 3' splice site (a 23-mer sequence with 20 bases in the intron and 3 bases in the exon). The higher the MaxEntScan score, the stronger is the splice site.

Genome data

Nucleotidic sequences were downloaded from public databases Genbank, Refseq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>). Primate sequences accession numbers are listed in table 2. In this study the exon/intron annotation is based on human annotated sequence. The sequences were aligned using MUSCLE algorithm in the CLCMainWorkbench v6 (www.clcbio.com). IL-4v2 sequence is available in GenBank under accession number JX878389.

RESULTS**IL-4 new splice variant**

Human T cell mRNAs extracted from a healthy donor were analyzed for transcription of IL-4 and IL-4 δ 2. Several bands were observed after RT-PCR and specific detection. After cloning these bands, 3 variants were sequenced including full-length IL-4 and IL-4 δ 2. A new variant was identified containing the 4 exons of IL-4, plus a 101 bp retention from intron 2 (Fig. 1a). This variant was termed IL-4v2 for IL-4 variant 2 (IL-4 δ 2 being the variant 1). In figure 1b are shown the IL-4 variants produced by alternative splicing in a healthy human sample of T cells: full-length IL-4, containing the 4 exons, IL-4 δ 2, deleted from the second exon and IL-4v2 with retention of 101bp of the second intron.

As shown in figure 2, upon amplification by PCR with primers from exon 1 (including ATG) to exon 4 (including stop codon), the three variants can be discriminated according to size: IL-4 at 462bp, IL-4 δ 2 at 414bp and IL-4v2 at 563bp. The IL-4v2 variant was amplified in several healthy donors (data not shown).

To consider this matured RNA as a new splice variant, and to categorize the 101 bases as a new exon, sequence consensus of splice sites flanking the retention must be present. A 3' splice site (SS) consensus sequence, composed of AG in the intronic sequence was found at the intron-exon junction of this new exon (Fig. 3). The 5' SS consensus sequence AG/GT, where the bases indicated by the bold letters correspond to those found in the exon was also identified exactly at the end of the base-pairs retained. This splice site can interact with the 3' SS of the exon 3. This result confirmed that typical features of 5' and 3' splice sites were conserved in the sequence of this new exon. Moreover, two putative branch points sequences CTNACT were located 15 and 38bp upstream the 3' SS with the adenosine as a key nucleotide. Between the branch point and the 3' SS, a succession of cytosines and thymines composing the polypyrimidine tract was also mapped. All the components needed for splicing were identified in the new exon and this result allowed us to speculate that the spliceosome machinery can process splicing around this region considered as a new exon.

To support this result, an *in silico* analysis on splicing sites were conducted. The strength of each splice site was calculated using MaxEntScan algorithm. From this scores (shown in table 3), we found that the retained part of intron 2 has strong values, and can be considered as real splice sites (positives scores). The 3' SS of the new exon obtained higher score (5,39) than the second exon (0,75), which is a constitutive exon of IL-4. The 5' SS was as strong as the sites of exons 1 and 2 (10,44 compared to 10,47 and 10,57). These results assessed for the existence of both new acceptor and donor sites and reinforce the consideration of this new exon.

IL-4v2 transcript is subject to NMD

As this new mRNA can be considered as a splicing product of the pre-mRNA of IL-4, we wondered which function this minor variant can have. Using the start codon in the first exon of the native IL-4, the translation of IL-4v2 led to a protein shorter than full sized IL-4. The 101bp retained after the second exon generated a shift in the open reading frame. The N terminal sequence was common with the IL-4 amino-acid sequence up to the end of the second exon and a stop codon was found prematurely in the third exon due to a shift in the reading frame caused by the addition of 101bp. This premature stop codon is located 50bp before the junction between the exons 3 and 4, the last exon-exon junction. As above mentioned, alternative splice sites of this new exon are stronger than the ones of the second exon. We can imagine that this variant can be generated more frequently than IL-4 δ 2. However, IL-4 δ 2 is often identified by PCR in several tissues from healthy people, but the new transcript found in lower quantities is usually not visualized by a non-selective PCR amplification. This remark favored the hypothesis of a degradation of the IL-4v2 mRNA. The presence of a premature stop codon in the last exon of IL-4v2 and the lower quantities of this new variant suggested that this new IL-4v2 mRNA could be targeted by NMD. To test this hypothesis, a NMD inhibition approach by cycloheximide (CHX), a protein

synthesis inhibitor acting on the 60S ribosomal subunit, as described in the literature (Schneider-Poetsch et al. 2010), was used. CHX is a molecule known to inhibit translation and indirectly stabilize mRNA due to the absence of the pioneer round of translation inducing the NMD degradation. Experimentally, CHX was used to prevent mRNA degradation in order to detect the NMD variant. A kinetic study was conducted in T cell sorted from PBMC from a healthy donor. The IL-4v2 mRNA level expressed by human cells is very low. As shown in figure 4, increase in the IL-4v2 mRNA level was observed by PCR with IL-4v2 primers 48 and 96 hours after activation. This indicated that the IL-4v2 mRNA could be degraded by the NMD process. However, at 24 and 72h after activation no increase, or even a decrease, was detected between conditions with or without CHX. These results were conflicting. Conducting experiments on human sample is often fluctuating, mostly for the detection of messenger RNAs expressed at very low level. Therefore to overcome the inherent variability observed between donors *in vitro* study were conducted. As any non transfected cell line is able to produce IL-4 (Brown 2008), HEK293T cells were transfected with plasmids encoding IL-4 or IL-4v2 cDNA. Knowing that this model, devoid of splicing, is *a priori* not ideal to demonstrate the NMD degradation of the IL-4v2 mRNA, the experiment was however tested. Recently, some studies suggested that the EJC complex previously defined as essential for the NMD process can act as an enhancer and other factors can interact in the NMD process (Kervestin and Jacobson 2012; Silva and Romão 2009). This indication motivated our first test in using available cDNA sequences. In our study, for IL-4v2 transfection, two plasmids derived from two independent clones were tested in parallel. After incubation with or without CHX, the mRNA level was determined by RT-PCR. An interesting result was obtained. The pattern observed on agarose gel (Fig. 5a) indicated that, the level of IL-4 remained unchanged with or without CHX as shown in PCR results. In contrast, the level of IL-4v2 was significantly increased with CHX treatment for both clones. No amplification was detected with Mock plasmid and the no RT conditions validate the RNA extraction and the DNase treatment eliminating plasmid contamination. Moreover, PCR controls (blanks and positives PCR on IL-4 and IL-4v2 sequences) also validated the experiment. Quantification of these PCR products by the bioanalyzer confirmed the observation done on agarose gel (Fig. 5b and c). In figure 5c are presented examples of electropherograms obtained after quantification of IL-4 or IL-4v2 PCR product. The peaks at the ends (15 and 1500bp) represented the upper and lower marker. Between these two peaks was present the PCR product corresponding to IL-4 or IL-4v2 according to migration time corresponding to the product size. Figure 5b is a quantification of the ratios IL-4 over neomycin (neo) gene amplification and IL-4v2 over neomycin gene amplification between conditions without and with CHX, for 4 independent experiments. Neomycin resistance is a gene present in the plasmid and expressed by all transfected cells. To consider the switch between both conditions, the quantification of IL-4/neo or IL-4v2/neo product without CHX was normalized to 1 and the condition with CHX was compared to this normalization. We can conclude that no significant difference was observed for IL-4 amplification with or without CHX. However, for IL-4v2 amplification, and for both clones, a significant increase was surprisingly observed between the condition without CHX and with CHX. Moreover, these results were reproduced in four independent experiments and with two clones of IL-4v2 plasmids. Thus, IL-4v2 mRNA, stabilized in presence of CHX, should indicate a degradation of IL-4v2 mRNA induced by an NMD process. In contrast, no differences were observed for IL-4 with CHX indicating that the IL-4 mRNA was not degraded by NMD.

To confirm the results obtained with IL-4 and IL-4v2, the same experiment of NMD inhibition approach by cycloheximide CHX were performed with the SC35 gene. Barbier *et. al.* demonstrated that the SC35 gene generated an alternatively spliced variant subject to the NMD process. Using specific primers, the SC35 translatable mRNA was amplified at 760bp and the NMD mRNA was amplified at 260bp. For each condition, the translatable transcript was amplified equally and the quantity of the NMD transcript was increased with CHX treatment. This was shown by agarose gel analysis (Fig. 6a) upon PCR amplification and quantification using bioanalyzer (Fig. 6b). Figure 6c shows an example of the discrimination between the two SC35 mRNAs using the bioanalyzer quantification.

This analysis interestingly showed the NMD characteristic of the IL-4v2 variant. Based on bioanalyzer quantification, and using the SC35 as an experimental positive control, we can conclude that the new variant isolated from a blood sample of a healthy human should be degraded by NMD process regulating the IL-4 gene expression.

In silico study in several species

A bioinformatics multiple alignment was conducted to investigate the conservation of this new exon among several species of primates. Alignments were performed to compare 9 primate sequences with the human new exon sequence. The 101bp new exon was well conserved in primates (Fig. 7). Moreover, splice sites were present in these species (Fig. 7). The 3' and the 5' splice sites, flanking the exon, had 100% of identity compared to human. For all species analyzed, a conserved region upstream the 3' splice site contained two putative branch

points (Fig.7 number 1) and a polypyrimidine tract associated (Fig.7 number 2). The closest branch point to the 3' SS was conserved in all species suggesting that it can be considered as functional. However, its very close proximity to the 3' SS led us to consider another branch point. Thus, this second branch point, less conserved between primates can be more easily bound by splicing proteins because of its location distant from the 3' SS avoiding steric hindrance. Sequence identity was calculated for the 9 primates sequences compared to human. The intron part was found as strictly (100% of sequence identity) identical in Chimpanzee (*Pan-Troglodytes*) and Bonobo (*Pan-paniscus*) and highly conserved (more than 89% sequence identity) for 5 primates (table 4 gray boxes). Concerning the 4 other primate species (*Saimiri-boliviensis*, *Callithrix-jacchus*, *Otolemur-garnettii* and *Microcebus-murinus*), more than 60% sequence identity indicated a good conservation. These differences correspond to the distance between these species and human in the phylogenetic tree (Perelman et al. 2011). These analyses suggest that this new exon can have a reality in primates like in humans. When analyzing translation of this new variant in different species of primates, several cases occurred. Chimpanzee (*Pan-Troglodytes*), Orangutan (*Pongo-abelii*) and Bonobo (*Pan-paniscus*) contain the same premature stop codon suggesting that the IL-4v2 variant in such species can be submitted to NMD degradation (fig. 8). For the Rhesus macaque (*macaca-mulatta*) and the baboon (*Papio-anubis*), the premature stop codon was located upstream in the exon 3 (fig.8). This situation may also induce degradation by the NMD process. However, for the marmoset (*Callithrix-jacchus*) and for the Galago (*Otolemur-garnettii*), the premature stop codon is located at the first codon of the new exon. For the two other species *Microcebus-murinus* and *Saimiri-boliviensis*, no stop codon is found in the translated IL-4v2 sequence. For the last 4 species and due to the weaker conservation compared to human, the IL-4v2 variant may not be conserved in these species.

The *Il4* gene structure is well conserved between species with 4 exons and 3 introns with very similar size. The IL-4 proteins follows the same level of sequence conservation in most of species. IL-4 is highly conserved between species. The presence of this new exon in other species such as carnivores, rodents, ungulates and insectivores was not identified by sequence comparison with human due to low level of nucleotides sequence conservation. In *mus musculus*, intron 2 has only 36% of identity with human intron 2, in particular because of a size difference of 1094nt between the two sequences. The new exon sequence does not seem to be conserved in *mus musculus* intron 2 sequences. However, the NMD regulation can exist in these other species and will be determined by further analyses.

DISCUSSION

IL-4 is a major regulatory cytokine of the immune system. Its preponderant role in allergy and asthma put it as a strategic axis of research. The discovery of alternatively spliced variant to this key cytokine appears to be critical for the comprehension of immune responses. IL-4 δ 2 seems to be a natural antagonist of IL-4. Using alternative splicing sites, the spliceosome is able to produce several mRNAs from a single pre-mRNA. In the case of IL-4, a shorter mRNA is often amplified in which exon 2 is omitted. The small size of the exon (48bp) generating proximity between the 3' and the 5' splice sites, negatively affect the splicing machinery. However, the spliceosome also use alternative splice sites to introduce new fragments that increase the size of mRNA. In the case of IL-4v2, the use of an alternative exon, present in intron 2, leads to a splicing combination giving a larger variant than the IL-4 mRNA. Indeed, from human T cells of a healthy donor, we have cloned and sequenced a new alternative splice variant of human IL-4 with a 101 base-pair retention from intron 2, called IL-4v2. The analysis of the consensus splice sites of this retention strongly indicates that the region retained can be considered as an alternative exon. The strength of the splice sites indicates that this new exon is as strong as constitutive exons of IL-4. However, the splice sites of exon 2 have very low scores, this can explain the frequency of the presence of IL-4 δ 2 from which the acceptor site is not well recognized. The exon 2 seems to be deleted frequently because of the low strength of this splice sites and the small size of the exon composed of only 48 bp. These 2 factors promote the deletion of exon 2.

In IL-4v2, the retention of 101bp of intron 2 induces a shift in the open reading frame. The presence of a premature stop codon located 50 nucleotides upstream the last exon-exon junction, lead us to investigate the NMD potential feature of this mRNA. Experiments on human T lymphocytes showed discordant results indicating a fluctuating model. We can however remark that the NMD and non-NMD pattern were alternating every 24 hours suggesting a cyclic effect of the NMD. A regulatory mechanism of the NMD process may interact. With *in vitro* activation, cells may produce factors reducing the splicing of NMD variants. Using a non perfect *in vitro* model, the treatment with cycloheximide of HEK293T transfected cells with plasmid containing cDNA sequences, translation of IL-4v2 induce a degradation process, preventing the mRNA from being translated into protein. In the same situation, the amount of IL-4 messenger was not increased in the presence of CHX. For the *in vitro* assay realized, the IL-4v2 and IL-4 cDNA sequences were brought to the cell by plasmid

transfection. Due to the lack of intron, splicing does not occur and no EJC can bind to the spliced junction. The NMD process is enhanced by a stop codon located upstream an EJC present at the exon-exon junction. This complex was described as essential for NMD engagement. In our experiment, we can envisage that another mechanism degrading mRNA may be involved but the closest similarity between the two constructions may induce a very delicate process of recognition. We can also suggest, that the NMD process distinguishing the PTC from the stop codon, is engaged, in spite of the absence of the EJC intervention.

In mammalian cells, activation of UPF1, major actor of the NMD signal, is often the consequence of an interaction between the ribosome complex and the near EJC. However, recent studies questioned the essential role of the EJC for NMD activation. In yeast, NMD can be activated when PABP protein is located at an abnormal distance to the PTC; this model is called faux 3'UTR (Amrani et al. 2004). In fact, when the poly(A), bound by the PABP protein, is proximal to the stop codon, eRF3, recruited by the stop codon signaling, interact with PABP inhibiting the interaction between eRF3 and UPF1. However, when the ribosome stop at a PTC, PABP cannot interact with the ribosome complex and UPF1 is free to bind to eRF3 inducing the NMD process (Singh et al. 2008).

Moreover, in yeast, when a PABP protein is located at a close distance to the PTC, a NMD process is not engaged, suggesting the mimicry of a normal 3'UTR situation (Amrani et al. 2004). The same assessment was done in *Drosophila melanogaster* (Behm-Ansmant et al. 2007). When 3'UTR length is increased, native stop codon is then located far from the PABP protein and this situation lead to NMD degradation in *D. melanogaster* (Behm-Ansmant et al. 2007). In mammalian system, recent data suggested that an increase of the 3'UTR length induce NMD degradation in Ig μ mRNA (Eberle et al. 2008; Singh et al. 2008). With these data, we suggest that the NMD process is not only or at least not always dependent of the EJC (enhancer of degradation), but also of the PABP protein location (repressor of the degradation). In our study, the distance between the PTC and PABP, or the mRNA structure, can prevent the interaction between PABP (located on the poly(A)) and eRF3 (recruited by the stop codon). This absence of interaction may induce the recruitment of UPF1 by eRF3 and the initiation of the NMD process.

More experiments should be realized to validate this hypothesis and to establish the NMD degradation of the IL-4v2 variant. Additional experiments with endogen IL-4v2 in cells from healthy donors should clarify the first results obtained. In addition, plasmid containing IL-4 or IL-4v2 cDNA sequences and the 3rd intron, inducing splicing and the presence of an EJC at the last exon-exon junction, should validates the NMD implication in the IL-4v2 mRNA degradation. This approach is actually on going.

The induction of the NMD process by IL-4v2 could be considered as a regulatory process for *Ii4* gene expression and bring a new level in the molecular regulation of the *Ii4* gene.

As alternative splicing, the NMD process is used differently between tissues, between individuals or according to pathologic stages. This variant is present in samples from several healthy donors suggesting that the use of this splicing pattern is not a consequence of a pathologic state. However, the presence of this variant should be investigated in pathologies such as asthma or allergy in which IL-4 is over-expressed. IL-4v2 is possibly more often used in pathological states to regulate an over-expression of IL-4. Hence, IL-4v2 can extend the cytokine network and the balance between Th1 and Th2 pattern, we might wonder if IL-4v2 can be more present in a Th1 response or whether when IL-4 is over-expressed in the aim of regulating inflammation to avoid an auto-immune reaction.

Here, we described also a bioinformatics analysis of *Ii4* gene and IL-4v2 splice variants across several species of primates. IL-4 sequence is highly conserved between human and simian species. While considering the IL-4 intron 2 sequence alignment between human and several species of monkeys, the new exon found in humans is also present in simian sequences. We might consider that this 101bp is an important region as 90% of this intron part is conserved in primates. We observed that the more conserved is IL-4 sequence, the more conserved is the new exon sequence. The analysis of the consensus splice sites of this retention strongly indicates that this retention can be considered as an exon. The bioinformatics study indicates that the alternative exon has been generated and selected during evolution. In the case of IL-4v2, it is likely to say that the human variant can have a correspondence in primates but not in other species.

The NMD is a mechanism used by mammalian cells but also by all vertebrates and lower species as bacteria or yeast (Maquat 1995; Morse and Yanofsky 1969; Peltz et al. 1993). The NMD components have their counterparts in all investigated organisms. Even if the IL-4v2 variant is not used by other species than primates, it does not mean that this species cannot use the NMD process as a regulation of *Ii4* gene expression with another alternative splice variant. We can also imagine that in species in which this new exon is absent, the regulation of the *Ii4* gene can use alternative mechanisms to regulate IL-4 expression. The potential absence of

NMD regulation of *Ii4* gene in mice and rats may explain the discrepancy between murine and human studies. The discovery of IL-4v2 in primates makes the simian model a preferential choice for the study of the IL-4-dependant immune responses.

This work highlights the importance of taking into account all the isoforms while measuring an immune response especially when we know that some of alternative splice variant can have antagonist roles. The immune response should be measured not only by the expression of a variant but also by the degradation of other ones. The discovery of a NMD transcript for a cytokine enriches the vision of the immune system regulation. From now, no other cytokine is known to be regulated by NMD. We can imagine that as IL-4 is using NMD to regulate its own expression. Other cytokines gene expression can also be regulated by alternative splicing and NMD combination. Further work need to be concentrated on NMD regulation of cytokines to bring a new comprehension level of the immune system regulation. We discovered a new regulation process to *Ii4* gene expression that improves the characterization and the comprehension of the immune system regulation.

AKNOWLEDGEMENT

We thank Emanuelle Trannoy and Catherine Moste for supporting the initiation of the project. We also thank Valérie Gafa for helpful discussions. The authors have no conflict of interest directly relevant to the content of this article.

REFERENCES

- Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, et al. (2004) A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432:112–118. doi: 10.1038/nature03060
- Arinobu Y, Atamas SP, Otsuka T, et al. (1999) Antagonistic Effects of an Alternative Splice Variant of Human IL-4, IL-4 δ 2, on IL-4 Activities in Human Monocytes and B Cells. *Cellular Immunology* 191:161–167. doi: 10.1006/cimm.1998.1431
- Atamas S, Choi J, Yurovsky V, White B (1996) An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation. *The Journal of Immunology* 156:435–441.
- Barbier J, Dutertre M, Bittencourt D, et al. (2007) Regulation of H-ras Splice Variant Expression by Cross Talk between the p53 and Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathways. *Mol Cell Biol* 27:7315–7333. doi: 10.1128/MCB.00272-07
- Behm-Ansmant I, Gatfield D, Rehwinkel J, et al. (2007) A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* 26:1591–1601. doi: 10.1038/sj.emboj.7601588
- Bijlsma FJ, van Kuik J, van Hoffen E, et al. (2002) Acute cardiac transplant rejection is associated with low frequencies of interleukin-4 producing helper T-Lymphocytes rather than with interleukin-4 promoter or splice variants. *Human Immunology* 63:317–323. doi: 10.1016/S0198-8859(02)00370-1
- Brown MA (2008) IL-4 production by T cells: you need a little to get a lot. *J Immunol* 181:2941–2942.
- Brown MA, Pierce JH, Watson CJ, et al. (1987) B cell stimulatory factor-1/interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell* 50:809–818. doi: 10.1016/0092-8674(87)90339-4
- Chen F, Liu Z, Wu W, et al. (2012) An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat Med* 18:260–266. doi: 10.1038/nm.2628
- Defrance T, Aubry JP, Rousset F, et al. (1987) Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med* 165:1459–1467.
- Demissie A, Abebe M, Aseffa A, et al. (2004) Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. *J Immunol* 172:6938–6943.
- Denesyuk AI, Zav'yalov VP, Denessiouk KA, Korpela T (1998) Molecular models of two competitive inhibitors, IL-2delta2 and IL-2delta3, generated by alternative splicing of human interleukin-2. *Immunol Lett* 60:61–66.

- Eberle AB, Stalder L, Mathys H, et al. (2008) Posttranscriptional Gene Regulation by Spatial Rearrangement of the 3' Untranslated Region. *PLoS Biol* 6:e92. doi: 10.1371/journal.pbio.0060092
- Essner R, Rhoades K, McBride WH, et al. (1989) IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J Immunol* 142:3857–3861.
- Gardner LB (2010) Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 8:295–308. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0502
- Gautherot I, Burdin N, Seguin D, et al. (2002) Cloning of interleukin-4 delta2 splice variant (IL-4 Δ 2) in chimpanzee and cynomolgus macaque: phylogenetic analysis of Δ 2 splice variant appearance, and implications for the study of IL-4-driven immune processes. *Immunogenetics* 54:635–644. doi: 10.1007/s00251-002-0510-4
- Howard M, Farrar J, Hilfiker M, et al. (1982) Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 155:914–923.
- Howard M, Paul WE (1982) Interleukins for B lymphocytes. *Lymphokine Res* 1:1–4.
- Jakubzick C, Kunkel SL, Puri RK, Hogaboam CM (2004) Therapeutic targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis. *Immunol Res* 30:339–349. doi: 10.1385/IR:30:3:339
- Kashima I, Yamashita A, Izumi N, et al. (2006) Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20:355–367. doi: 10.1101/gad.1389006
- Kervestin S, Jacobson A (2012) NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:700–712. doi: 10.1038/nrm3454
- Kuperman DA, Schleimer RP (2008) Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Curr Mol Med* 8:384–392.
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:189–192. doi: 10.1073/pnas.0136770100
- Luzina IG, Lockett V, Lavania S, et al. (2012) Natural production and functional effects of alternatively spliced interleukin-4 protein in asthma. *Cytokine*. doi: 10.1016/j.cyto.2011.12.017
- MacGlashan D Jr, White JM, Huang SK, et al. (1994) Secretion of IL-4 from human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J Immunol* 152:3006–3016.
- Maquat LE (1995) When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1:453–465.
- Maquat LE (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:89–99. doi: 10.1038/nrm1310

- Maquat LE, Tam W-Y, Isken O (2010) The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* 142:368–374. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.022
- Morse DE, Yanofsky C (1969) Polarity and the degradation of mRNA. *Nature* 224:329–331.
- Mosmann TR, Bond MW, Coffman RL, et al. (1986) T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5654–5658.
- Peltz SW, Brown AH, Jacobson A (1993) mRNA destabilization triggered by premature translational termination depends on at least three cis-acting sequence elements and one trans-acting factor. *Genes Dev* 7:1737–1754. doi: 10.1101/gad.7.9.1737
- Perelman P, Johnson WE, Roos C, et al. (2011) A Molecular Phylogeny of Living Primates. *PLoS Genet* 7:e1001342. doi: 10.1371/journal.pgen.1001342
- Perkins HD, van Leeuwen BH, Hardy CM, Kerr PJ (2000) THE COMPLETE cDNA SEQUENCES OF IL-2, IL-4, IL-6 AND IL-10 FROM THE EUROPEAN RABBIT (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*). *Cytokine* 12:555–565. doi: 10.1006/cyto.1999.0658
- Postlethwaite AE, Seyer JM (1991) Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4. Identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70-88 and 89-122. *J Clin Invest* 87:2147–2152. doi: 10.1172/JCI115247
- Rhodes SG, Sawyer J, Whelan AO, et al. (2007) Is Interleukin-4 δ 3 Splice Variant Expression in Bovine Tuberculosis a Marker of Protective Immunity? *Infect Immun* 75:3006–3013. doi: 10.1128/IAI.01932-06
- Romagnani S (1991) Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 12:256–257.
- Rousset F, Malefijt RW, Slierendregt B, et al. (1988) Regulation of Fc receptor for IgE (CD23) and class II MHC antigen expression on Burkitt's lymphoma cell lines by human IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol* 140:2625–2632.
- Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, et al. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6:209–217. doi: 10.1038/nchembio.304
- Seder RA, Paul WE, Dvorak AM, et al. (1991) Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2835–2839.
- Shields JG, Armitage RJ, Jamieson BN, et al. (1989) Increased expression of surface IgM but not IgD or IgG on human B cells in response to IL-4. *Immunology* 66:224–227.
- Silva AL, Romão L (2009) The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Letters* 583:499–505. doi: 10.1016/j.febslet.2008.12.058

- Singh G, Rebbapragada I, Lykke-Andersen J (2008) A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol* 6:e111. doi: 10.1371/journal.pbio.0060111
- Sorg RV, Enczmann J, Sorg UR, et al. (1993) Identification of an alternatively spliced transcript of human interleukin-4 lacking the sequence encoded by exon 2. *Exp Hematol* 21:560–563.
- Steinke JW (2004) Anti-interleukin-4 therapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 24:599–614, vi. doi: 10.1016/j.iac.2004.06.008
- Tsytsikov VN, Yurovsky VV, Atamas SP, et al. (1996) Identification and characterization of two alternative splice variants of human interleukin-2. *J Biol Chem* 271:23055–23060.
- Yatsenko OP, Filipenko ML, Khrapov EA, et al. Alternative splicing of mRNA of mouse interleukin-4 and interleukin-6. *Cytokine* 28:190–196. doi: 10.1016/j.cyto.2004.08.009
- Yuan Z, Wang R, Lee Y, et al. (2009) Tuberculosis-Induced Variant IL-4 mRNA Encodes a Cytokine Functioning As Growth Factor for (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl Pyrophosphate-Specific V γ 2V δ 2 T Cells. *The Journal of Immunology* 182:811–819.
- Zaretsky AG, Taylor JJ, King IL, et al. (2009) T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med* 206:991–999. doi: 10.1084/jem.20090303

FIGURES

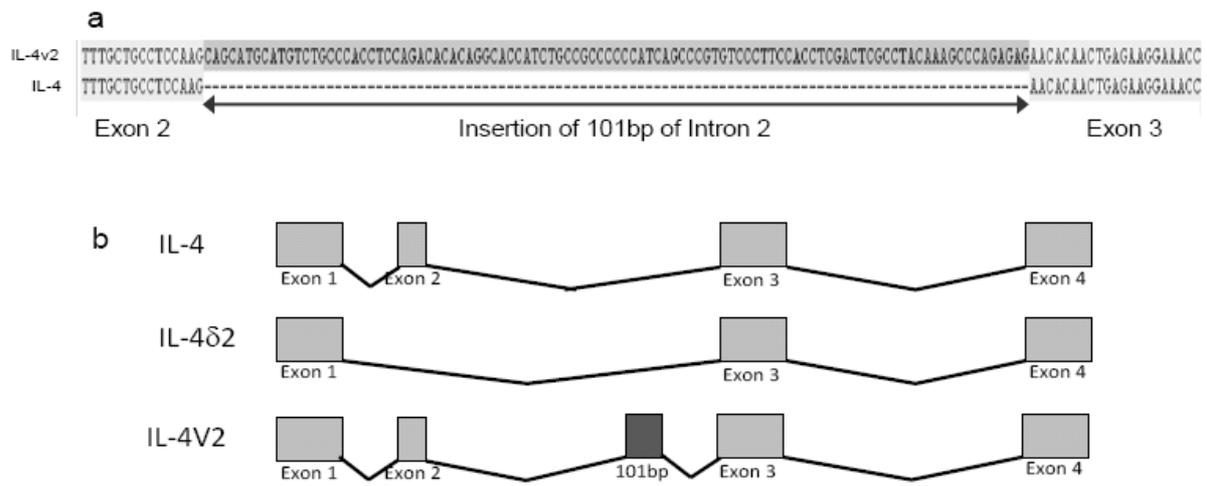


Fig. 1 Human IL-4 alternative splice variants. a : Sequence of the insertion of 101pb of intron 2 between exon 2 and 3 in IL-4v2. b: Alternative splice variants of IL-4: IL-4 composed of 4 exons, IL-4 δ 2 deleted of exon 2 and IL-4v2 with retention of 101bp of intron 2

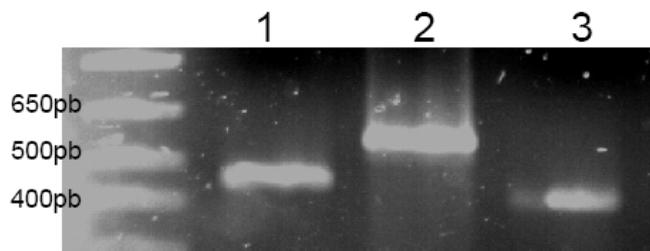


Fig. 2 Amplification of the IL-4 splice variants from ATG to stop. 1: IL-4 (462bp), 2: IL-4v2 (563bp), 3: IL-4 Δ 2 (414bp)

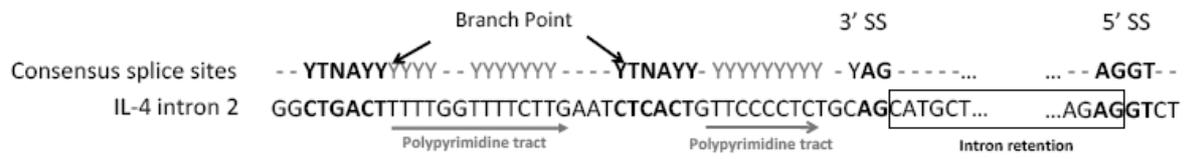


Fig. 3 Splice site consensus sequences of the new exon of IL-4. A box represents the 101bp intron retention. In intron 2, 3' SS and 5' SS are flanking this new exon. Putative branch point sequences are located approximately 18-40bp upstream the exon and a combination of T and C can be considered as the polypyrimidine tract between the branch point and the 3' SS

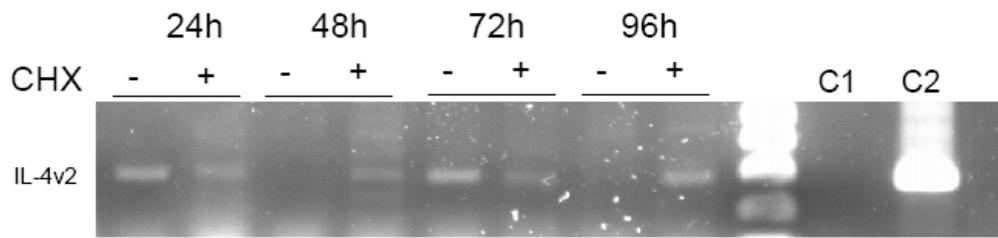


Fig. 4 IL-4v2 mRNA amplification after cycloheximide treatment T cells from healthy donor activated during 24h, 48h, 72h and 96h. C1 corresponds to PCR negative control, C2 corresponds to IL-4v2 PCR positive control

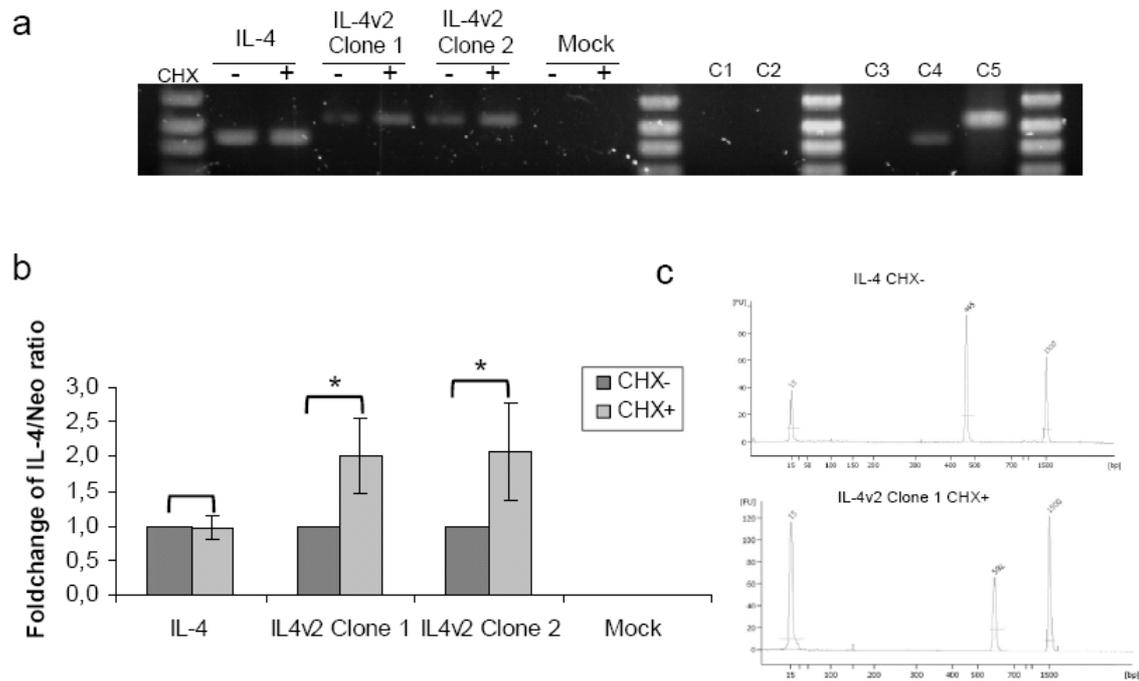


Fig. 5 Cycloheximide treatment of transfected HEK293T cells results in an increase of IL-4v2 mRNA. **a:** PCR amplification of IL-4 (462bp) and IL-4v2 (563bp) in cells treated or not with CHX. IL-4v2 mRNA level is increased with CHX. C1 corresponds to noRT control with IL-4 CHX- sample - C2 corresponds to noRT control with IL-4v2 clone 1 CHX+ sample - C3 is PCR negative control (Blank) - C4 is PCR positive control for IL-4 - C5 is PCR positive control for IL-4v2.

b: PCR quantification using bioanalyzer. The histograms show the IL-4/neo or IL-4v2/neo quantification and standard deviations from four independent experiments. Conditions without CHX were normalized to 1 and conditions with CHX were compared to the corresponding normalized data. In dark grey is shown the conditions without CHX treatment and in light grey, the conditions with CHX treatment. * corresponds to p value >0,001.

c: Bioanalyzer electropherograms showing IL-4 and IL-4v2 amplification

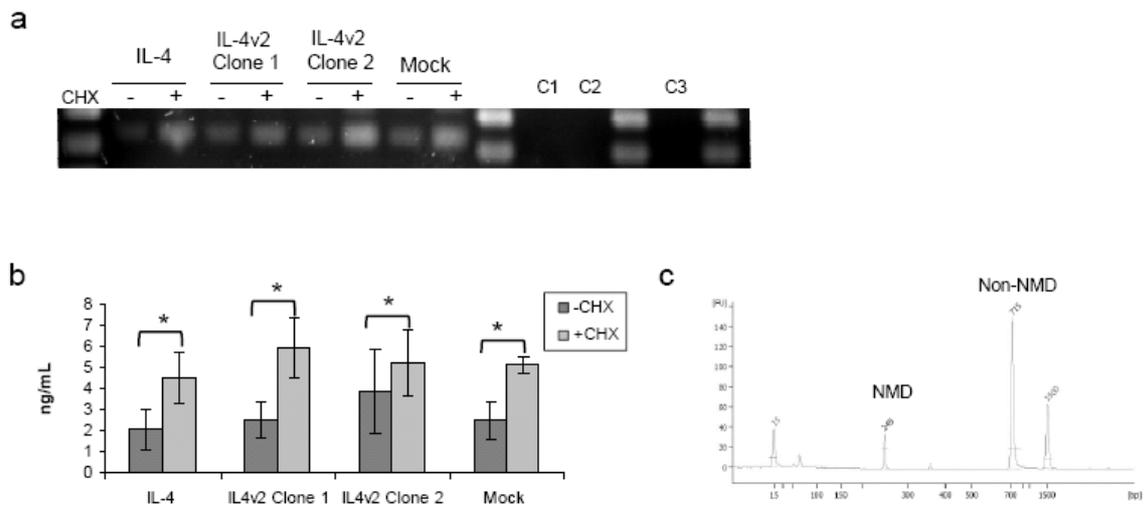


Fig. 6 Validation of the cycloheximide treatment of HEK293T cells by amplification of the SC35 variants as NMD positive control. a: PCR amplification of the SC35 NMD transcript (260bp). The NMD mRNA level is increased with CHX. C1 correspond to noRT control with IL-4 CHX- sample – C2 correspond to noRT control with IL-4v2 clone 1 CHX+ sample – C3 is PCR negative control (Blank) –

b: PCR quantification using bioanalyzer. The histograms show the mean and standard deviations from four independent experiments. In dark grey is shown the conditions without CHX treatment and in light grey, the conditions with CHX treatment. * corresponds to pvalue < 0,005.

c: Bioanalyzer electropherograms showing SC35 NMD transcript (~260bp) and the translatable transcript (~760bp)

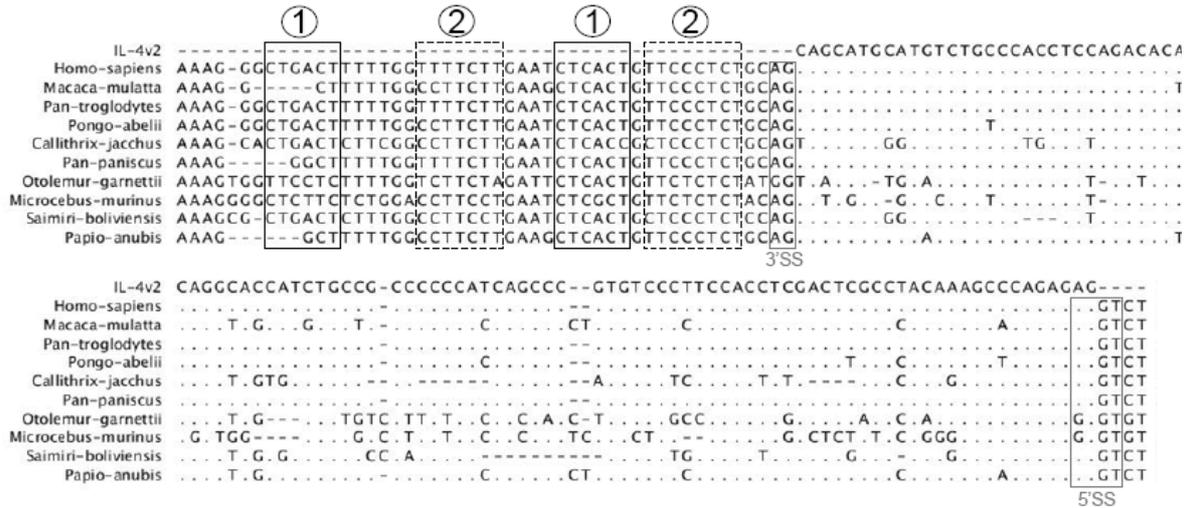


Fig. 7 Alignment of the IL-4v2 new exon with intron 2 sequences of human and some primates. Number 1 indicates the putative branch points, number 2, the putative polypyrimidine tract associated. 3'SS and 5'SS are mentioned at the flanking extremities of the new exon. Identical sequences of the new exon are symbolized by a dot and a gap in the sequence is symbolized by an hyphen

	exon2		New exon	
Homo-sapiens	TLCTELTVTD	I FAASKQHAC	LPTSRHTG-T	ICRPPSARVP
Macaca-mulatta	TLCTKLTITD	I LAASKQHAC	LPTSRHSG-S	MCCPPPAPV-
Pan-troglodytes	TLCTKLTVTD	I FAASKQHAC	LPTSRHTG-T	ICRPPSARVP
Pongo-abelii	TLCTELTVTD	I FAASKQHAC	LSTSRHTG-T	ICRPPPARVP
Callithrix-jacchus	TLCTKLTIMD	I FAASKQHAC	LPTSRHTG-T	ICRPPSARVP
Pan-paniscus	TLCTELTVTD	I FAASKQHAC	LPTSRHTG-T	ICRPPSARVP
Otolemur-garnettii	TPCDELTVAD	I FAASKQHAC	LPTSRHTG-T	ICRPPSARVP
Papio-anubis	TLCTKLTITD	I LAASKQHAY	LPTSRHSG-S	ICRPPPAPV-

	New exon		Exon 3	
Homo-sapiens	STSTRLQ--S	PERTQLRRKP	SAGLRLCSGS	STATMRRTLA
Macaca-mulatta	--SPPPR--L	AHKAQREHNX	SAGLRLCSGS	STATMRRTLA
Pan-troglodytes	STSTRLQ--S	PERTQLRRKP	SAGLRLCSGS	STATMRRTLA
Pongo-abelii	STSTCPQ--S	SERTQLRRKP	SAGLRLCSGS	STATMRRTLA
Callithrix-jacchus	STSTRLQ--S	PERTQLRRKP	SAGLRLCSGS	STATMRRTLA
Pan-paniscus	STSTRLQ--S	PERTQLRRKP	SAGLRLCSGS	STATMRRTLA
Otolemur-garnettii	STSTRLQ--S	PERTQLRRKP	SAGLRLCSGS	STATMRRTLA
Papio-anubis	--SPPPR--L	AHKAQREHNX	SAGLRLCSGS	STATMRRTLA

Homo-sapiens	AWVRLHSSST	GTSSXSDSX	
Macaca-mulatta	AWVRLHSSST	GTSSXSDSX	
Pan-troglodytes	AWVRLHSSST	GTSSXSDSX	
Pongo-abelii	VWVRLHSSST	DTSSSSDSX	
Callithrix-jacchus	AWVRLHSSST	GTSSXSDSX	
Pan-paniscus	AWVRLHSSST	GTSSXSDSX	
Otolemur-garnettii	AWVRLHSSST	GTSSXSDSX	
Papio-anubis	AWVRLHSSST	GTSSXSDSX	

Fig. 8 Alignment of the IL-4v2 translated sequences of human and some primates. X letter indicates the premature stop codon. Exon delimitation are annotated

TABLES

Table 1 Primer sequences for PCR amplification

EEF1G f	GCTCACCTGCCCAAGAGTACC
EEF1G r	GACCAGCCGTCCTTATCAAAGTC
SC35 f	GCGGTGTCCTCTTACAAGAAAATGATG
SC35 r	GCACAGACAAGGCATCTTTAC
IL4 f	ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTT
IL4 r	TCAGCTCGAACACTTTGAATATTTTC
IL4KpnI	GATCGGTACCGCCGCCACCATGGGTCTCA
IL4XhoI	GATCCTCGAGCTACTCACTCAGCTCGAACACTTTGAATATTTCTC

Table 2 Primates DNA sequences used for alignment analyses. The accession number and the common name are indicated

Latin names	Common names	Accession number
<i>Macaca-mulatta</i>	Rhesus macaque	NC_007863
<i>Pan-troglodytes</i>	Chimpanzee	NC_006472
<i>Pongo-abelii</i>	Orangutan	NC_012596
<i>Callithrix-jacchus</i>	Marmoset	NC_013897
<i>Pan-paniscus</i>	Bonobo	NW_003870594
<i>Otolemur-garnettii</i>	Greater Galago	NW_003852398
<i>Microcebus-murinus</i>	Grey mouse lemur	micMur1
<i>Saimiri-boliviensis</i>	Bolivian Squirrel Monkey	NW_003943605
<i>Papio-anubis</i>	Baboon	CM001496

Table 3 Scores of the IL-4 exon splice sites calculated with the MaxEntScan algorithm. The new exon gets a 3'SS score lower than the exon 3 and 4 score, but higher than the second exon. However, the 5'SS of this new exon is as strong as 5'SS of exons 1 and 2

	3'SS	5'SS
Exon 1	/	10.47
Exon 2	0.75	10.57
Intron 2 retention	5.39	10.44
Exon 3	10.07	8.72
Exon 4	10.19	/

Table 4 Percentage of identity between DNA sequence of the human new exon and the intron 2 sequence of several primates

Species	% Identity
<i>Pan-paniscus</i>	100
<i>Pan-Troglodytes</i>	100
<i>Pongo-abelii</i>	95,05
<i>Papio-anubis</i>	90,29
<i>Macaca-mulatta</i>	89,32
<i>Saimiri-boliviensis</i>	74,51
<i>Callithrix-jacchus</i>	70,3
<i>Otolemur-garnettii</i>	66,99
<i>Microcebus-murinus</i>	62,5

PARTIE III

Analyse de variants d'épissage de cytokines par NGS

Suite aux différentes expériences réalisées, 3 nouveaux variants de l'IL-4 ont été découverts. Dans le but de faire un bilan de tous les variants de l'IL-4 et grâce aux avancées technologiques récentes sur le séquençage, nous avons décidé d'utiliser le séquençage nouvelle génération pour aller en profondeur dans la connaissance des variants de l'IL-4.

Ces nouvelles technologies de séquençage offrent la possibilité d'un séquençage complet du transcriptome. Dans notre cas, la technologie Illumina a été choisie. Ainsi par séquençage des petits fragments (entre 100 et 300pb) il est possible de mettre en évidence de nouvelles jonctions entre les exons, et potentiellement de nouveaux exons.

Le séquençage a été effectué sur un échantillon de lymphocyte T humain issu d'un donneur sain, activé pendant 4 jours avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28. L'ARN a été extrait de ces cellules, puis la qualité de l'ARN a été vérifiée au bioanalyser avant utilisation. Après sélection par le polyA et rétro transcription, le séquençage a été réalisé. Ces manipulations ont été réalisées au sein du laboratoire ProfileXpert à Lyon, équipé d'un appareil Illumina. Le protocole choisi a été un RNAseq paired-end avec lecture en 2x101pb. Les données ont ensuite été analysées avec les logiciels TopHat et Genespring (Agilent).

Les cytokines sont faiblement exprimées et les analyses réalisées à l'aide des logiciels TopHat et Genespring ne nous ont pas permis de révéler la présence de variants d'épissage pour les cytokines sélectionnées. Or dans le cas de l'IL-4, il a été déterminé par RT-PCR que l'IL-4 δ 2 est présent dans l'échantillon. La présence de ce variant nous permet d'avoir un contrôle positif de notre analyse bioinformatique. Les algorithmes utilisés n'ont pas montré la présence de l'IL-4 δ 2 dans notre échantillon. En effet la faible couverture de l'ARNm de l'IL-4 par rapport aux nombreux ARN majoritaires apporte un frein à l'analyse. L'IL-4 δ 2 encore moins présente dans l'échantillon n'est pas détectée comme variants d'épissage par les logiciels. Ainsi les paramètres classiques du logiciel ne sont pas suffisants pour une telle détection, une analyse plus complète est nécessaire.

La difficulté d'analyse vient d'une identification difficile due à des ARN peu présents dans l'échantillon. Ainsi deux stratégies sont à prévoir pour combler cette difficulté. La première consiste à mettre en place des outils bioinformatiques permettant une analyse fine et ciblée des gènes faiblement exprimés. Une seconde stratégie considère la préparation de l'échantillon. En effet, un enrichissement des ARNm à analyser par l'utilisation de puces ou de billes (type Nimblegen) permettrait de cibler les cytokines cibles ce qui requiert un travail important de design en amont. Une déplétion des ARN majoritaires présents dans l'échantillon par le traitement à la DSN (Duplex Specific Nuclease) permettraient également d'améliorer la couverture de séquençage des gènes cibles. Ainsi les ADNc majoritaires seront dégradés pour une meilleure analyse des ADNc minoritaires. Ces améliorations sont donc à prendre en considération pour de nouvelles expériences.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le système immunitaire est une machinerie complexe permettant au corps de se défendre contre les différentes attaques extérieures. Dans le cadre de la vaccinologie, il est important de bien connaître ce système afin de caractériser la réponse induite par un antigène vaccinal. Pour cela, il est nécessaire de déterminer et d'approfondir la compréhension des mécanismes de défenses immunitaires. Le processus d'épissage alternatif est décrit pour de nombreux gènes amenant de la complexité et un nouveau niveau de régulation de l'expression génique. Le système immunitaire n'échappe pas à ce phénomène. De plus, depuis peu, de nouveaux acteurs complexifient l'équilibre Th1/Th2 des lymphocytes Thelpers : les Th17, Th9 et Th22 par exemple, semblent jouer des rôles dans différentes infections et pathologies. L'étude de la réponse immunitaire doit prendre en compte ces nouvelles cellules et les cytokines qui leur sont associées.

Encore mal connus et peu décrits, les variants d'épissage des cytokines semblent cependant incontournables, notamment par leurs potentielles fonctions antagonistes. Le travail sur les cytokines est délicat du fait de la faible expression de celle-ci même après stimulation cellulaire. Par conséquent, le cas des variants d'épissage de cytokines, encore plus faiblement exprimés, est rendu difficile. De plus, commercialement, aucun outil n'est disponible pour la détection des variants et isoformes moléculaires, ce qui constitue un manque considérable et un obstacle à tout travail sur la réponse immunitaire. Le travail présenté dans ce mémoire s'intéresse à l'épissage alternatif de l'IL-4, cytokine clef du système immunitaire. Le but de ce travail était de mieux caractériser un variant de l'IL-4 humaine : l'IL-4 δ 2.

Caractérisation de l'IL-4 δ 2

De nombreuses études ont montrées que l'expression des variants d'épissage peut être spécifique d'un tissu, d'un stimulus ou d'un état pathologique et leur présence ou leur niveau d'expression peut en faire des biomarqueurs potentiels et intéressants.

Afin de détecter et de quantifier les ARNmessagers des variants d'épissage de l'IL-4, des outils spécifiques sont nécessaires. Dans la littératures, différents auteurs utilisent des outils dont la spécificité n'est pas démontrée^{88,89,160}. Cependant, mon travail de thèse m'a

confirmé la difficulté intrinsèque d'une telle investigation et surtout que la spécificité des outils utilisés est primordiale. Pour la réalisation d'une qPCR, on sait par expérience que 6 bases peuvent suffire à induire l'amorçage d'une amplification aspécifique, ce qui implique de s'assurer de l'amplification spécifique dans le design d'amorces de variants d'épissage. Au cours de ce projet, des amorces qPCR spécifiques ont été définies, et la démonstration de leur spécificité a été apportée. Cette validation constitue la force de cet outil et nous assure de la fiabilité des résultats obtenus à partir de ces amorces. Nous avons donc utilisé ces amorces spécifiques afin de quantifier l'expression des variants d'épissage de l'IL-4 chez des personnes saines. Ceci a été effectué afin d'avoir un état basal de l'expression de l'IL-4 et de l'IL-4 δ 2 chez des personnes saines dans le but de le comparer à d'éventuelles situations physiologiques ou pathologiques d'intérêt. Une étude cinétique réalisée sur des lymphocytes T de personnes saines activés 3 jours a montré un caractère donneur-spécifique de l'expression de l'IL-4 et de son variant. Les quantités d'IL-4 sont très faibles et les taux d'expression relatif des ARNm d'IL-4 et d'IL-4 δ 2 varient différemment en fonction des donneurs. Ce travail mérite d'être approfondi par l'ajout de nouveaux échantillons afin d'obtenir une cohorte de donneurs adéquate pour permettre une analyse statistique. Ces résultats sont néanmoins en accord avec les résultats obtenus par Luzina *et al.* sur l'étude de l'expression des ARNm de l'IL-4 et de l'IL-4 δ 2 chez les asthmatiques pour lesquels la variabilité est importante entre les donneurs. Ainsi, dans cette population asthmatique, aucune corrélation n'a pu être apportée entre les taux d'IL-4 et d'IL-4 δ 2 et la pathologie.

L'IL-4 est faiblement exprimée chez les personnes saines, ce qui nous a conduit à nous intéresser à des patients asthmatiques. En effet, l'asthme est une pathologie dans laquelle l'IL-4 est impliquée et fortement exprimée, ceci nous permet de considérer l'expression relative des variants de l'IL-4. Cette étude, en collaboration avec l'université de Reims, n'a pu être réalisée dans les temps. Cependant, pendant la progression de notre projet, le groupe d'Atamas a publié une étude cinétique sur l'expression de l'IL-4 et de l'IL-4 δ 2 chez les asthmatiques⁸⁰. Ces résultats montrent qu'il ne semble pas y avoir de cohérence entre les différents donneurs et qu'il existe une grande variabilité inter-donneurs. Il serait néanmoins intéressant d'effectuer une étude sur différentes pathologies respiratoires dans lesquelles l'IL-4 est surexprimée, et cela chez des patients à différents stades de la maladie. Ainsi une comparaison de personnes avec une pathologie sévère ou en exacerbation permettrait peut-être de détacher un profil menant à l'utilisation de l'IL-4 δ 2 en tant que biomarqueur. L'étude sur des populations plus susceptibles aux maladies parasitaires pourrait également être

envisagée. En effet, l'IL-4 est fortement exprimée dans l'induction d'une réponse IgE susceptible de contrôler une infection parasitaire. Cette situation provoquant la surexpression d'IL-4 pourrait de même induire une surexpression de son variant l'IL-4 δ 2.

Une problématique intéressante et encore peu étudiée concerne les cellules exprimant l'IL-4 δ 2. En effet, la plupart des études considèrent ce variant dans les PBMC. Suite à un tri cellulaire, l'expression de l'IL-4 δ 2 a été étudiée sur un donneur dans des PBMC, des cellules CD4⁺ et CD8⁺. L'ARNm de l'IL-4 δ 2 est détecté dans les PBMC, mais pas dans les cellules CD4⁺ et CD8⁺ de ce donneur. Il se peut alors qu'une autre sous-population de cellules parmi les PBMC soit capable d'exprimer ce variant. Ces cellules peuvent être des lymphocytes T $\gamma\delta$, des monocytes, des cellules NK ou encore des cellules NKT. Il est à noter que les cellules granuleuses d'un second donneur triées par polymorphoprep sont des cellules dans lesquelles l'ARNm de l'IL-4 δ 2 a été retrouvé. Or on sait que les basophiles et les éosinophiles sont des producteurs d'IL-4. De plus, les éosinophiles sont largement sollicités dans le cas de l'asthme, et si ces cellules produisent de l'IL-4 δ 2, alors cet isoforme pourrait être surexprimé dans cette pathologie et être considéré comme un facteur à part entière avec un rôle défini. On peut également suggérer que son expression par les cellules granuleuses puisse être utilisée en temps que biomarqueur de la pathologie.

Le travail sur la détection de l'IL-4 protéique est délicat du fait de sa sécrétion à faible concentration. Pour travailler sur la forme protéique de l'IL-4 δ 2, seul le Western Blot peut discriminer, par la taille, les formes IL-4 et IL-4 δ 2 reconnues par le même anticorps. Cependant la sensibilité de détection limite cette méthode en raison de la faible quantité d'IL-4 produite, même après activation cellulaire. La découverte de l'IL-4 δ 2 sous forme protéique est très récente. Luzina *et al.* l'ont détectée début 2012, chez des personnes asthmatiques mais ne l'ont pas retrouvée chez des personnes saines. Cette avancée a été faite grâce à un anticorps spécifique de l'IL-4 δ 2 utilisé en ELISA, toutefois, aucune information sur la fabrication de cet anticorps et sa validation n'est apportée. On en retient néanmoins, que l'IL-4 δ 2 sous forme protéique aurait tendance à être exprimée après l'IL-4 indiquant un rôle régulateur de la part de cette isoforme.

Des études se contredisent quant à la fonction de l'IL-4 δ 2. Certaines la suggèrent antagoniste^{85,90,118} et d'autres agonistes⁷⁹. Afin de définir les fonctions de cette protéine, nous l'avons produite de façon recombinante. Cependant, cette expression s'est révélée délicate.

Un constat intéressant a été son absence de production par les cellules humaines HEK293T et le parasite *Leishmania tarentolae*. Ceci semble nous indiquer que les cellules eucaryotes ne sont pas capables d'exprimer une telle protéine (hors cas pathologique). Ce constat est troublant car l'IL-4 produite par les cellules humaines est très similaire à l'IL-4 δ 2 pour laquelle seuls 16 acides aminés sont délétés. Il est difficile de comprendre qu'avec si peu de différences au niveau protéique, la production d'une telle protéine est difficile. Il se pose alors la question de la dégradation de l'ARN messenger de l'IL-4 δ 2. Cet ARN ne possède pas les caractéristiques pour déclencher un signal de dégradation du type NMD, à savoir un codon stop prématuré 50 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon ou encore un codon stop éloigné de la queue poly(A). Quel pourrait-être le signal déclencheur de la dégradation de cet ARNm ? La régulation de l'expression d'un gène peut se produire par la dégradation de l'ARNm ou par l'inhibition de la traduction de celui-ci. La dégradation spécifique de l'ARN messenger de l'IL-4 δ 2 pourrait être la cause d'ARN interférents : les micro ARN (miRNA) ou les small interfering ARN (siARN). Parmi eux, les miRNA sont décrits comme étant des petits ARN se fixant de manière non spécifique sur la partie 3'UTR des ARN messagers et pouvant inhiber la traduction de nombreux ARNm avec des séquences similaires. Au vue de la grande similitude des séquences de l'IL-4 et de l'IL-4 δ 2 et de leur partie 3'UTR commune, cette hypothèse ne semble pas envisageable. Par contre, les siRNA, issus de la dégradation d'ARN double brin sont décrits comme se fixant spécifiquement à un ARNm et induisant son clivage. Ce cas pourrait être envisagé en admettant qu'un siRNA complémentaire de la région spécifique de la jonction exon 1-exon 3 existe.

Dans le cas où la protéine IL-4 δ 2 puisse être produite par la cellule et dans une visée thérapeutique, l'étude de sa fonction est essentielle. Ainsi, la protéine IL-4 δ 2 a été produite de façon recombinante en système bactérien et purifiée. Afin de valider la fonctionnalité de nos protéines IL-4 et IL-4 δ 2 produites en bactéries SHuffle, un test au CFSE a été réalisé sur une lignée cellulaire possédant les récepteurs à l'IL-4 à sa surface. Ce test a montré une faible fonctionnalité de l'IL-4 recombinante produite en bactéries SHuffle par rapport à une protéine commerciale. De plus, l'absence d'induction de prolifération des cellules TF-1 par l'IL-4 δ 2 montre son impossibilité à induire la prolifération cellulaire. Ceci confirme les résultats précédents suggérant une absence d'activité de la part de ce variant et pose la question de l'induction potentielle d'un signal par l'IL-4 δ 2 via le récepteur à l'IL-4.

Pour vérifier l'hypothèse de la fonction antagoniste de l'IL-4 δ 2 vis-à-vis de l'IL-4, une étude sur l'induction des voies de signalisation de l'IL-4 par ce variant a été réalisée. Nos résultats montrent que l'IL-4 δ 2 n'induit pas la phosphorylation de STAT-6. Or STAT-6 est le facteur de transcription principal induit par l'IL-4 lors de la différenciation des cellules Th2 et des caractéristiques phénotypiques. Ceci suggère que l'IL-4 δ 2 n'est pas capable d'induire les mêmes effets que l'IL-4 et notamment la prolifération et la différenciation cellulaire. L'IL-4 δ 2 n'est également pas capable de phosphoryler STAT-5. Ce facteur est peu phosphorylé par l'IL-4 (phosphorylation non détectée dans nos conditions) mais il était envisagé que l'IL-4 δ 2 puisse utiliser un autre facteur de transcription comme alternative. Nous avons également montré que l'IL-4 δ 2 n'est pas capable d'induire la phosphorylation d'IRS2. L'activation d'IRS2 par l'IL-4 induit deux voies de signalisation, la voie RAS/MAK et la voie AKT3 qui permettent respectivement le maintien cellulaire et la croissance. L'IL-4 δ 2 ne semble pas d'envoyer de tels signaux à la cellule. Les voies de signalisation principales utilisées par l'IL-4 ne semblent pas induites par fixation de l'IL-4 δ 2 sur les récepteurs à l'IL-4. Une hypothèse a été avancée quant au caractère Th1 de l'IL-4 δ 2. On peut alors se demander si STAT-4, le facteur de transcription caractéristique de la lignée Th1, ne pourrait pas être activé par cette cytokine.

Dans la littérature, l'IL-4 δ 2 est considérée comme un antagoniste et un agoniste de l'IL-4. Des résultats *in vivo* et *in vitro* valident chacune de ces hypothèses. Ainsi, il est à envisager que l'IL-4 δ 2 puisse être considérée comme un agoniste et un antagoniste de l'IL-4 en fonction du contexte d'étude, des cellules étudiées et de l'état physiologique.

De plus, l'IL-4 et l'IL-4 δ 2 partagent le même récepteur, pour lequel l'affinité de l'IL-4 semble supérieure à celle de l'IL-4 δ 2⁴¹, suggérant que l'interaction entre le récepteur et l'IL-4 est favorisée par rapport à une interaction avec l'IL-4 δ 2. Ceci semble expliquer que l'action inhibitrice de l'IL-4 δ 2 ne soit révélée qu'avec une très forte quantité d'IL-4 δ 2 correspondant à une quantité de 20 à 200 fois supérieure à celle de l'IL-4⁷⁴. Cette situation ne semble pas révélatrice d'un phénomène physiologique mais pourrait suggérer l'utilisation de l'IL-4 δ 2 comme traitement de pathologies dans lesquelles l'IL-4 est fortement impliquée. A l'heure actuelle, il semble important de comprendre la fonction de l'IL-4 δ 2. Un approfondissement des voies de signalisation induites par la protéine, notamment les voies Th1, pourrait permettre de déterminer son implication en tant qu'agoniste ou antagoniste de l'IL-4. De plus, l'étude de différentes lignées cellulaires telles qu'une lignée lymphocytes T humaine

(JURKAT), une lignée lymphocytaire B humaine (RAJI) ou encore des cellules tumorales de poumon humain telles que les cellules H358 pourrait amener un éclaircissement quant à l'induction d'un signal par l'IL-4 δ 2 dans différents types cellulaires.

Il serait également intéressant de poursuivre les études *in vivo* entamées par le groupe d'Atamas. L'étude *in vivo* effectuée a été réalisée sur des souris de phénotype sauvage ainsi que sur le modèle de l'asthme murin, par la méthode d'instillation d'un adénovirus dans les poumons ce qui a induit la production de la cytokine IL-4 δ 2. Dans les souris de phénotype sauvages, cette étude a démontré un caractère agoniste de l'IL-4 δ 2 par induction d'infiltration de lymphocytes T dans les poumons. Un caractère antagoniste est également établi par l'induction d'un changement cytokinique de l'IL-4 δ 2 par rapport à l'IL-4, par l'expression d'IFN- γ notamment, suggérant un rôle Th1 pour l'IL-4 δ 2. Dans le cas du modèle murin de l'asthme, l'IL-4 et l'IL-4 δ 2 humaine aggravent l'inflammation et augmentent le nombre d'éosinophiles dans les poumons. Cependant, les limites de ce modèle sont l'infection des cellules épithéliales par les adénovirus, ainsi ce sont les cellules épithéliales qui, dans ce cas, produisent les cytokines. Or ces cellules ne sont pas naturellement productrices de cytokines. Pour s'affranchir de ce biais, une injection des protéines IL-4 et IL-4 δ 2 dans les souris sauvages, en intra trachéal ou en intra veineuse, nous permettrait de connaître la distribution et les effets des deux cytokines. Une comparaison avec une situation de cas d'asthme murin pourrait nous permettre de d'établir un mécanisme d'action de la part de ces 2 cytokines et de détacher la fonction de l'IL-4 δ 2 dans le cas de l'asthme. Il serait également intéressant d'étudier l'IL-4 δ 2 dans une situation d'infection parasitaire avec le parasite *Trichuris muris* par exemple.

La sécrétion d'IL-4 δ 2 à partir de lymphocytes T activés de personnes asthmatiques a lieu lorsque la quantité d'IL-4 diminue⁸⁰. Il est alors suggéré que la sécrétion d'IL-4 δ 2 se fasse dans un contexte de régulation de la production d'IL-4 et de la réponse immunitaire Th2. Cette régulation, par la sécrétion du variant d'épissage de l'IL-4, préviendrait une réponse Th2 excessive. Cependant cette observation n'a pas lieu au niveau des ARN messagers de personnes saines dans notre étude, ni au niveau des ARN messagers de personnes asthmatiques dans l'étude de Luzina et al⁸⁰. Contrairement à la volonté de faire de l'ARNm de l'IL-4 δ 2 un biomarqueur, il est alors envisageable d'utiliser la protéine IL-4 δ 2 comme biomarqueur de la pathologie asthmatique.

L'ARNmessenger de l'IL-4 δ 2 est exprimé dans de nombreux types cellulaires et de façon variable en fonction des personnes dans les conditions testées. Même s'il semble plus fortement exprimé chez certaines personnes asthmatiques, cette situation ne peut être généralisée à toutes les personnes atteintes de cette pathologie. Ainsi la détection de ce variants, très variable d'une personne à l'autre, d'un type cellulaire à l'autre, semble peu propice en tant que tel à une utilisation en temps que biomarqueurs de la pathologie asthme. Cependant la forme protéique pourrait avoir ce rôle car elle n'a pour l'instant été détectée que chez des personnes atteintes d'asthme⁸⁰. Cependant, l'absence de recul sur la méthode de détection utilisée, sur la reproductibilité à grande échelle et la très faible quantité de protéines produites rend cette méthode délicate et peu fiable. Dans le cas de l'asthme, mais aussi d'autres pathologies pour lesquelles l'IL-4 δ 2 a été détectée (SIDA et Tuberculose), la question du dérèglement du ratio IL-4 δ 2/IL-4 en tant que cause ou conséquence de la pathologie se pose.

La régulation de l'épissage alternatif

Le nombre important de sites et de facteurs impliqués dans la régulation de l'épissage suggère un haut niveau de contrôle. Les gènes des interleukines et de leurs récepteurs sont sujets à l'épissage alternatif ce qui produit une grande diversité de fonctions et régulations de la réponse immunitaire et un puissant système de modulation. L'usage d'exons alternatifs peut être contrôlé par les cellules, les tissus, l'état pathologique. Des changements dans les choix des sites d'épissage sont connus dans différentes maladies humaines. Toutefois, il n'est pas défini si l'épissage alternatif peut être considéré comme une cause ou plutôt une conséquence d'un état pathologique. Les changements d'expression relatifs des variants d'épissage d'un gène peuvent résulter de mutations dans les éléments régulateurs d'épissage ou de variations dans la composition, concentration ou localisation des protéines régulatrices.

Le variant d'épissage de l'IL-4 le plus étudié est l'IL-4 δ 2. Cependant d'autres variants ont été décrits. En effet chez le bovin, l'IL-4 δ 3 a été identifié⁶⁹, le variant VIL-4⁷¹ chez le macaque et la découverte toute récente chez l'homme de l'IL-4alt3¹⁶¹, variant possédant une délétion partielle de l'exon 3. Durant ce travail de thèse, 3 autres variants de l'IL-4 humaine ont été identifiés dans notre laboratoire, chacun contenant une rétention d'une partie d'intron. L'un d'entre eux a particulièrement retenu notre attention. En effet, l'IL-4v2 dont 101 paires

de bases d'intron 2 sont retenues sous forme d'un nouvel exon, se trouve être soumise au NMD. Ce mécanisme de régulation apporte un nouveau niveau de compréhension de la régulation de l'IL-4. Aucune cytokine n'est actuellement connue pour être régulée par le processus NMD. Ceci ouvre donc une porte sur un mécanisme de régulation jusqu'alors non attribué aux cytokines. Il serait donc intéressant d'étudier cette situation pour d'autres cytokines, ce qui enrichirait le réseau cytokinique, la régulation du système immunitaire et ceci pourrait amener des réponses à certaines pathologies et dérives immunitaires.

Le déclenchement du procédé NMD était jusqu'alors caractérisé par l'interaction du ribosome avec le codon stop prématuré en amont d'une jonction exon-exon marquée par un complexe nommé EJC. Récemment, ce mécanisme s'est révélé ne pas être exclusif et certains auteurs suggèrent que le complexe d'épissage peut parfois être considéré comme favorisant le NMD plus que comme facteur essentiel dans le déclenchement du mécanisme NMD^{162,163}. Ainsi la distance entre le PTC et la protéine PABP fixée sur le poly(A) semble également être un facteur important chez la levure¹⁶⁴, la drosophile¹⁶⁵, mais aussi chez les mammifères^{139,166}. Il est alors suggéré que le processus NMD n'est pas seulement dépendent de la présence d'un EJC (favorisant la dégradation), mais aussi de la situation de la protéine PABP (répresseur de la dégradation). Nos expériences réalisées en absence d'EJC tendent à appuyer la possibilité de l'intervention de la dégradation NMD par la détermination d'un codon stop prématuré par sa distance avec la protéine PABP.

L'IL-4 δ 2 est un variant naturellement présent chez de nombreuses espèces. De par cette forte conservation entre les espèces, il se peut alors qu'il intervienne dans un mécanisme de régulation de l'IL-4. Par contre l'IL-4v2 ne semble pas être aussi bien conservé. En effet seuls les primates pourraient exprimer ce variant. Ainsi, le mécanisme NMD a pu être amené à jouer un rôle régulateur de l'IL-4 suite à l'évolution des espèces.

Les rétentions d'intron ou partie d'intron sont peu communes dans les cas d'épissage alternatifs de cytokines, généralement décrits avec une délétion d'un ou plusieurs exons. Cette insertion pose la question des dérives d'épissage. De quelles manières ces dérives peuvent-elle apparaître? Est-ce par un état de stress, par une pathologie? Il s'en suit également la question sur le devenir de tels ARNm. On peut se demander si les ARNm correspondants peuvent alors être détruits par la cellule, et dans ce cas, se demander la manière dont l'ARNm va être dégradé et par quel signal est induite cette dégradation. Certains variants pouvant être traduits et les protéines correspondantes, tronquées ou supplémentées d'acides aminés peuvent être néfastes pour la cellule et induire des situations pathologiques. La régulation de l'épissage alternatif est primordiale au bon fonctionnement cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hiscott, J. & Ware, C. Cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 561–563 (2011).
2. Auron, P. E. *et al.* Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7907–7911 (1984).
3. Tamiya, T., Kashiwagi, I., Takahashi, R., Yasukawa, H. & Yoshimura, A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 980–985 (2011).
4. Paul, W E Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* **57**, 521–524 (1989).
5. Umeshita-Suyama, R. *et al.* Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor alpha chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation. *Int. Immunol.* **12**, 1499–1509 (2000).
6. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K. & Ahmed, R. From vaccines to memory and back. *Immunity* **33**, 451–463 (2010).
7. Wisniewski, J. A. & Borish, L. Novel cytokines and cytokine-producing T cells in allergic disorders. *Allergy Asthma Proc* **32**, 83–94 (2011).
8. Pulendran, B. & Ahmed, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849–863 (2006).
9. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233–240 (2005).
10. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **9**, 1341–1346 (2008).
11. Morrison, P. J., Ballantyne, S. J. & Kullberg, M. C. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. *Immunology* **133**, 397–408 (2011).
12. Plotkin Vaccines, 5th Edition. *Vaccines, 5th edition* (2008).
13. Paul, W. E. & Zhu, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 225–235 (2010).
14. Williams, C. M. M., Rahman, S., Hubeau, C. & Ma, H.-L. Cytokine Pathways in Allergic Disease. *Toxicologic Pathology* (2012).doi:10.1177/0192623311430694
15. Howard, M. *et al.* Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.* **155**, 914–923 (1982).
16. Yokota, T. *et al.* Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5894–5898 (1986).
17. Brown, M. A. *et al.* B cell stimulatory factor-1/interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell* **50**, 809–818 (1987).
18. Gessner, A., Mohrs, K. & Mohrs, M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J. Immunol.* **174**, 1063–1072 (2005).
19. MacGlashan, D., Jr *et al.* Secretion of IL-4 from human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J. Immunol.* **152**, 3006–3016 (1994).

20. Seder, R. A. *et al.* Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 2835–2839 (1991).
21. Bijlsma, F. J. *et al.* Acute cardiac transplant rejection is associated with low frequencies of interleukin-4 producing helper T-Lymphocytes rather than with interleukin-4 promoter or splice variants. *Human Immunology* **63**, 317–323 (2002).
22. LaPorte, S. L. *et al.* Molecular and Structural Basis of Cytokine Receptor Pleiotropy in the Interleukin-4/13 System. *Cell* **132**, 259–272 (2008).
23. Chatila, T. A. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends Mol Med* **10**, 493–499 (2004).
24. Steinke, J. W. Anti-interleukin-4 therapy. *Immunol Allergy Clin North Am* **24**, 599–614, vi (2004).
25. Defrance, T. *et al.* Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **165**, 1459–1467 (1987).
26. Jiang, H., Harris, M. B. & Rothman, P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 1063–1070 (2000).
27. Alms, W. J., Atamas, S. P., Yurovsky, V. V. & White, B. Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing. *Molecular Immunology* **33**, 361–370 (1996).
28. Kelly-Welch, A., Hanson, E. M. & Keegan, A. D. Interleukin-4 (IL-4) pathway. *Sci. STKE* **2005**, cm9 (2005).
29. Arinobu, Y. *et al.* Antagonistic Effects of an Alternative Splice Variant of Human IL-4, IL-4 δ 2, on IL-4 Activities in Human Monocytes and B Cells. *Cellular Immunology* **191**, 161–167 (1999).
30. Pillai, M. R. & Bix, M. Evolution of IL4 and pathogen antagonism. *Growth Factors* **29**, 153–160 (2011).
31. Chen, F. *et al.* An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat. Med.* **18**, 260–266 (2012).
32. Zaretsky, A. G. *et al.* T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med* **206**, 991–999 (2009).
33. Brown, M. A. IL-4 production by T cells: you need a little to get a lot. *J. Immunol.* **181**, 2941–2942 (2008).
34. Paul, W. E. What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo? *Immunol. Cell Biol.* **88**, 236–239 (2010).
35. Le Gros, G., Ben-Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D. & Paul, W. E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.* **172**, 921–929 (1990).
36. Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B. & Rao, A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 607–656 (2006).
37. Humbert, M. *et al.* L'interleukine 4 et ses récepteurs dans l'asthme□: données actuelles. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **41**, 50–54 (2001).
38. Chomarat, P. & Banchereau, J. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur. Cytokine Netw.* **8**, 333–344 (1997).
39. Smith, L. J. *et al.* Comparison of four independently determined structures of human recombinant interleukin-4. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 301–310 (1994).
40. Zav'yalov, V. P. *et al.* Molecular model of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4 δ 2, a naturally occurring inhibitor of IL-4-stimulated T cell proliferation. *Immunology Letters* **58**, 149–152 (1997).
41. Vasiliev, A. M. *et al.* Structural and functional properties of IL-4 δ 2, an alternative splice variant of human IL-4. *J. Proteome Res.* **2**, 273–281 (2003).

42. Dheda, K. *et al.* The stability of mRNA encoding IL-4 is increased in pulmonary tuberculosis, while stability of mRNA encoding the antagonistic splice variant, IL-4delta2, is not. *Tuberculosis (Edinb)* **87**, 237–241 (2007).
43. Yarovinsky, T. O., Butler, N. S., Monick, M. M. & Hunninghake, G. W. Early exposure to IL-4 stabilizes IL-4 mRNA in CD4+ T cells via RNA-binding protein HuR. *J. Immunol.* **177**, 4426–4435 (2006).
44. Lowenthal, J. W. *et al.* Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells. *J Immunol* **140**, 456–464 (1988).
45. Paul, W. E. Interleukin 4: signalling mechanisms and control of T cell differentiation. *Ciba Found. Symp.* **204**, 208–216; discussion 216–219 (1997).
46. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J. & Paul, W. E. THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annual Review of Immunology* **17**, 701–738 (1999).
47. Kruse, S., Forster, J., Kuehr, J. & Deichmann, K. A. Characterization of the membrane-bound and a soluble form of human IL-4 receptor alpha produced by alternative splicing. *Int. Immunol.* **11**, 1965–1970 (1999).
48. Fernandez-Botran, R., Chilton, P. M., Ma, Y., Windsor, J. L. & Street, N. E. Control of the production of soluble interleukin-4 receptors: implications in immunoregulation. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 499–504 (1996).
49. Russell, S. M. *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* **262**, 1880–1883 (1993).
50. Wills-Karp, M. & Finkelman, F. D. Untangling the Complex Web of IL-4- and IL-13-Mediated Signaling Pathways. *Sci. Signal.* **1**, pe55 (2008).
51. Kraich, M. *et al.* A modular interface of IL-4 allows for scalable affinity without affecting specificity for the IL-4 receptor. *BMC Biol* **4**, 13 (2006).
52. Gilmour, J. & Lavender, P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells. *Immunology* **124**, 437–444 (2008).
53. Rolling, C., Treton, D., Pellegrini, S., Galanaud, P. & Richard, Y. IL4 and IL13 receptors share the gamma c chain and activate STAT6, STAT3 and STAT5 proteins in normal human B cells. *FEBS Lett.* **393**, 53–56 (1996).
54. Umeshita-Suyama, R. *et al.* Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor alpha chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation. *Int. Immunol.* **12**, 1499–1509 (2000).
55. Rahaman, S. O., Vogelbaum, M. A. & Haque, S. J. Aberrant Stat3 signaling by interleukin-4 in malignant glioma cells: involvement of IL-13Ralpha2. *Cancer Res.* **65**, 2956–2963 (2005).
56. Stritesky, G. L. *et al.* The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development. *Immunity* **34**, 39–49 (2011).
57. Lischke, A. *et al.* The interleukin-4 receptor activates STAT5 by a mechanism that relies upon common gamma-chain. *J. Biol. Chem.* **273**, 31222–31229 (1998).
58. Friedrich, K. *et al.* Activation of STAT5 by IL-4 relies on Janus kinase function but not on receptor tyrosine phosphorylation, and can contribute to both cell proliferation and gene regulation. *Int. Immunol.* **11**, 1283–1294 (1999).
59. Keegan, A., Nelms, K. & Paul, W. E. The IL-4 receptor--signaling mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **365**, 211–215 (1994).
60. Kuperman, D. A. & Schleimer, R. P. Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Curr. Mol. Med.* **8**, 384–392 (2008).
61. van Panhuys, N. *et al.* In vivo studies fail to reveal a role for IL-4 or STAT6 signaling in Th2 lymphocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 12423–12428 (2008).

62. Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A. & Strober, W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* **18**, 415–428 (2003).
63. Wilson, C. B., Makar, K. W., Shnyreva, M. & Fitzpatrick, D. R. DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. *Seminars in Immunology* **17**, 105–119 (2005).
64. Koyanagi, M. *et al.* EZH2 and Histone 3 Trimethyl Lysine 27 Associated with Il4 and Il13 Gene Silencing in TH1 Cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 31470–31477 (2005).
65. Pai, S.-Y., Truitt, M. L. & Ho, I.-C. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1993–1998 (2004).
66. Li-Weber, M. & Krammer, P. H. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 534–543 (2003).
67. Perkins, H. D., van Leeuwen, B. H., Hardy, C. M. & Kerr, P. J. THE COMPLETE cDNA SEQUENCES OF IL-2, IL-4, IL-6 AND IL-10 FROM THE EUROPEAN RABBIT (ORYCTOLAGUS CUNICULUS). *Cytokine* **12**, 555–565 (2000).
68. Yatsenko, O. P. *et al.* Alternative splicing of mRNA of mouse interleukin-4 and interleukin-6. *Cytokine* **28**, 190–196
69. Rhodes, S. G. *et al.* Is Interleukin-4 δ 3 Splice Variant Expression in Bovine Tuberculosis a Marker of Protective Immunity? *Infect Immun* **75**, 3006–3013 (2007).
70. Gautherot, I., Burdin, N., Seguin, D., Aujame, L. & Sodoyer, R. Cloning of interleukin-4 delta2 splice variant (IL-4 δ 2) in chimpanzee and cynomolgus macaque: phylogenetic analysis of δ 2 splice variant appearance, and implications for the study of IL-4-driven immune processes. *Immunogenetics* **54**, 635–644 (2002).
71. Yuan, Z. *et al.* Tuberculosis-Induced Variant IL-4 mRNA Encodes a Cytokine Functioning As Growth Factor for (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl Pyrophosphate-Specific V γ 2V δ 2 T Cells. *The Journal of Immunology* **182**, 811–819 (2009).
72. Ledru, E. *et al.* A nonsecreted variant of interleukin-4 is associated with apoptosis: implication for the T helper-2 polarization in HIV infection. *Blood* **101**, 3102–3105 (2003).
73. Sorg, R. V., Enczmann, J., Sorg, U. R., Schneider, E. M. & Wernet, P. Identification of an alternatively spliced transcript of human interleukin-4 lacking the sequence encoded by exon 2. *Exp. Hematol.* **21**, 560–563 (1993).
74. Atamas, S., Choi, J., Yurovsky, V. & White, B. An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation. *The Journal of Immunology* **156**, 435–441 (1996).
75. Tsytsikov, V. N., Yurovsky, V. V., Atamas, S. P., Alms, W. J. & White, B. Identification and Characterization of Two Alternative Splice Variants of Human Interleukin-2. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23055–23060 (1996).
76. Atamas, S. P. & White, B. Interleukin 4 in systemic sclerosis: not just an increase. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 658–659 (1999).
77. Atamas, S. P. *et al.* Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* **42**, 1168–1178 (1999).
78. Seah, G. T., Gao, P. S., Hopkin, J. M. & Rook, G. a. W. Interleukin-4 and Its Alternatively Spliced Variant (IL-4 δ 2) in Patients with Atopic Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **164**, 1016–1018 (2001).
79. Luzina, I. G. *et al.* Splice isoforms of human interleukin-4 are functionally active in mice in vivo. *Immunology* **132**, 385–393 (2011).
80. Luzina, I. G. *et al.* Natural production and functional effects of alternatively spliced interleukin-4 protein in asthma. *Cytokine* (2012).doi:10.1016/j.cyto.2011.12.017

81. Demissie, A. *et al.* Healthy individuals that control a latent infection with Mycobacterium tuberculosis express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. *J. Immunol.* **172**, 6938–6943 (2004).
82. Sakkas, L. I., Tourtellotte, C., Berney, S., Myers, A. R. & Platsoucas, C. D. Increased levels of alternatively spliced interleukin 4 (IL-4delta2) transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 660–664 (1999).
83. Jain-Vora, S. *et al.* Interleukin-4 Enhances Pulmonary Clearance of Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun* **66**, 4229–4236 (1998).
84. Hanania, N. A. Targeting airway inflammation in asthma: current and future therapies. *Chest* **133**, 989–998 (2008).
85. Kips, J. C. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl* **34**, 24s–33s (2001).
86. Isidoro-García, M. *et al.* Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study. *Clin Mol Allergy* **3**, 15 (2005).
87. Fletcher, H. A. *et al.* Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4delta2 in cells from contacts of Mycobacterium tuberculosis, in the absence of in vitro stimulation. *Immunology* **112**, 669–673 (2004).
88. Plante, S. *et al.* Mast cells regulate procollagen I (alpha 1) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/IL-4 delta 2 ratio. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 1321–1327 (2006).
89. Glare, E. M., Divjak, M., Rolland, J. M. & Walters, E. H. Asthmatic airway biopsy specimens are more likely to express the IL-4 alternative splice variant IL-4delta2. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 978–982 (1999).
90. Modi, W. S. *et al.* Haplotype diversity in the interleukin-4 gene is not associated with HIV-1 transmission and AIDS progression. *Immunogenetics* **55**, 157–164 (2003).
91. Clerici, M. & Shearer, G. M. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* **14**, 107–111 (1993).
92. Lawn SD AIDS in Africa: the impact of coinfections on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Journal of Infection* **48**, 1–12 (2004).
93. Kazazi, F. *et al.* Recombinant interleukin 4 stimulates human immunodeficiency virus production by infected monocytes and macrophages. *J Gen Virol* **73**, 941–949 (1992).
94. Gauthier, S. & Tremblay, M. J. Interleukin-4 inhibits an early phase in the HIV-1 life cycle in the human colorectal cell line HT-29. *Clinical Immunology* **135**, 146–155 (2010).
95. Dheda, K. *et al.* Expression of a novel cytokine, IL-4delta2, in HIV and HIV-tuberculosis co-infection. *AIDS* **19**, 1601–1606 (2005).
96. Rook, G. A. W., Dheda, K. & Zumla, A. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine* **23**, 2115–2120 (2005).
97. Rook, G. A. W., Hernandez-Pando, R., Dheda, K. & Teng Seah, G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol.* **25**, 483–488 (2004).
98. Djoba Siawaya, J. F. *et al.* Differential expression of interleukin-4 (IL-4) and IL-4 delta 2 mRNA, but not transforming growth factor beta (TGF-beta), TGF-beta RII, Foxp3, gamma interferon, T-bet, or GATA-3 mRNA, in patients with fast and slow responses to antituberculosis treatment. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1165–1170 (2008).
99. Gilbert, W. Why genes in pieces? *Nature* **271**, 501 (1978).
100. Berget, S. M. Exon Recognition in Vertebrate Splicing. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 2411–2414 (1995).
101. Wahl, M. C., Will, C. L. & Lührmann, R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* **136**, 701–718 (2009).
102. Maquat, L. E., Tarn, W.-Y. & Isken, O. The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* **142**, 368–374 (2010).

103. Warf, M. B. & Berglund, J. A. Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 169–178 (2010).
104. Mount, S. M. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* **10**, 459–472 (1982).
105. Rogers, J. & Wall, R. A mechanism for RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1877–1879 (1980).
106. Padgett, R. A., Konarska, M. M., Grabowski, P. J., Hardy, S. F. & Sharp, P. A. Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* **225**, 898–903 (1984).
107. Lopez, A. J. ALTERNATIVE SPLICING OF PRE-mRNA: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation. *Annual Review of Genetics* **32**, 279–305 (1998).
108. Lerner, M. R. & Steitz, J. A. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5495–5499 (1979).
109. Chen, M. & Manley, J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2009).doi:10.1038/nrm2777
110. Zamore, P. D. & Green, M. R. Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *PNAS* **86**, 9243–9247 (1989).
111. Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H. & Lührmann, R. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* **452**, 846–850 (2008).
112. Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 89–99 (2004).
113. Will, C. L. & Lührmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, (2011).
114. McManus, C. J. & Graveley, B. R. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 373–379 (2011).
115. Patel, A. A. & Steitz, J. A. Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 960–970 (2003).
116. Yu, J. *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296**, 79–92 (2002).
117. DeNoto, F. M., Moore, D. D. & Goodman, H. M. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3719–3730 (1981).
118. Choi, E., Kuehl, M. & Wall, R. RNA splicing generates a variant light chain from an aberrantly rearranged kappa gene. *Nature* **286**, 776–779 (1980).
119. Graveley, B. R. Alternative splicing: regulation without regulators. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 13–15 (2009).
120. Haj Khelil, A., Deguillien, M., Morinière, M., Ben Chibani, J. & Baklouti, F. Cryptic splicing sites are differentially utilized in vivo. *FEBS Journal* **275**, 1150–1162 (2008).
121. Modrek, B. & Lee, C. A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* **30**, 13–19 (2002).
122. Nilsen, T. W. & Graveley, B. R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* **463**, 457–463 (2010).
123. Schmucker, D. *et al.* Drosophila Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell* **101**, 671–684 (2000).
124. Cáceres, J. F. & Kornblihtt, A. R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* **18**, 186–193 (2002).

125. Boggs, R. T., Gregor, P., Idriss, S., Belote, J. M. & McKeown, M. Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the transformer gene. *Cell* **50**, 739–747 (1987).
126. Chou, T. B., Zachar, Z. & Bingham, P. M. Developmental expression of a regulatory gene is programmed at the level of splicing. *EMBO J.* **6**, 4095–4104 (1987).
127. Amrein, H., Gorman, M. & Nöthiger, R. The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* **55**, 1025–1035 (1988).
128. Fededa, J. P. & Kornblihtt, A. R. A splicing regulator promotes transcriptional elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 779–781 (2008).
129. Matlin, A. J., Clark, F. & Smith, C. W. J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 386–398 (2005).
130. Xiao, X. & Lee, J.-H. Systems analysis of alternative splicing and its regulation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, 550–565 (2010).
131. Zhou, H.-L. & Lou, H. Repression of prespliceosome complex formation at two distinct steps by Fox-1/Fox-2 proteins. *Mol. Cell Biol.* **28**, 5507–5516 (2008).
132. Mercatante, D. & Kole, R. Modification of alternative splicing pathways as a potential approach to chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* **85**, 237–243 (2000).
133. Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R. & Misteli, T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144**, 16–26 (2011).
134. Luco, R. F. & Misteli, T. More than a splicing code: integrating the role of RNA, chromatin and non-coding RNA in alternative splicing regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 366–372 (2011).
135. Shoemaker, C. J. & Green, R. Translation drives mRNA quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 594–601 (2012).
136. Gardner, L. B. Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* **8**, 295–308 (2010).
137. Nagy, E. & Maquat, L. E. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 198–199 (1998).
138. Brogna, S. & Wen, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 107–113 (2009).
139. Singh, G., Rebbapragada, I. & Lykke-Andersen, J. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* **6**, e111 (2008).
140. Zhang, Z. *et al.* Noisy splicing, more than expression regulation, explains why some exons are subject to nonsense-mediated mRNA decay. *BMC Biol* **7**, 23 (2009).
141. Bateman, J. F., Freddi, S., Natrass, G. & Savarirayan, R. Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 217–225 (2003).
142. Corcos, L. & Solier, S. [Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics]. *Med Sci (Paris)* **21**, 253–260 (2005).
143. Germann, S., Gratadou, L., Dutertre, M. & Auboeuf, D. Splicing programs and cancer. *J Nucleic Acids* **2012**, 269570 (2012).
144. Ule, J. *et al.* Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse. *Nat. Genet.* **37**, 844–852 (2005).
145. Auboeuf, D., Carmo-Fonseca, M., Valcarcel, J. & Biamonti, G. Alternative splicing and cancer. *J Nucleic Acids* **2012**, 363809 (2012).
146. Mazoyer, S. *et al.* A BRCA1 Nonsense Mutation Causes Exon Skipping. *The American Journal of Human Genetics* **62**, 713–715 (1998).

147. Holzmann, K. *et al.* Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor IgIII Loops in Cancer. *J Nucleic Acids* **2012**, 950508 (2012).
148. Végran, F. *et al.* Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene* **26**, 290–297 (2007).
149. Rosenstein, B. J. & Cutting, G. R. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J. Pediatr.* **132**, 589–595 (1998).
150. Denesyuk, A. I., Zav'yalov, V. P., Denessiouk, K. A. & Korpela, T. Molecular models of two competitive inhibitors, IL-2delta2 and IL-2delta3, generated by alternative splicing of human interleukin-2. *Immunol. Lett.* **60**, 61–66 (1998).
151. Bihl, M. P. *et al.* Identification of a Novel IL-6 Isoform Binding to the Endogenous IL-6 Receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 48–56 (2002).
152. Vudattu, N. K., Magalhaes, I., Hoehn, H., Pan, D. & Maeurer, M. J. Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes Immun.* **10**, 132–140 (2009).
153. Whitaker, E. L., Filippov, V., Filippova, M., Guerrero-Juarez, C. F. & Duerksen-Hughes, P. J. Splice variants of mda-7/IL-24 differentially affect survival and induce apoptosis in U2OS cells. *Cytokine* **56**, 272–281 (2011).
154. Heinhuis, B. *et al.* Inflammation-dependent secretion and splicing of IL-32{gamma} in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 4962–4967 (2011).
155. Konrad, L. *et al.* Alternative splicing of TGF-beta and their high-affinity receptors T beta RI, T beta RII and T beta RIII (betaglycan) reveal new variants in human prostatic cells. *BMC Genomics* **8**, 318 (2007).
156. Tsytsikov, V. N., Yurovsky, V. V., Atamas, S. P., Alms, W. J. & White, B. Identification and characterization of two alternative splice variants of human interleukin-2. *J. Biol. Chem.* **271**, 23055–23060 (1996).
157. Annibali, G. *et al.* The expression analysis of mouse interleukin-6 splice variants argued against their biological relevance. *BMB Rep* **45**, 32–37 (2012).
158. Denessiouk, K. A., Denesyuk, A. I. & Johnson, M. S. Negative modulation of signal transduction via interleukin splice variation. *Proteins* **71**, 751–770 (2008).
159. Hu, X. & Zuckerman, K. S. Cloning and sequencing of an alternative splicing-derived cDNA variant of the GM-CSF receptor alpha subunit, which encodes a truncated protein. *Am. J. Hematol.* **58**, 145–147 (1998).
160. Seah, G. . & Rook, G. A. . A sensitive, non-radioactive quantitative method for measuring IL-4 and IL-4delta2 mRNA in unstimulated cells from multiple clinical samples, using nested RT-PCR. *Journal of Immunological Methods* **228**, 139–149 (1999).
161. Yatsenko, O. P. *et al.* Tissue-Specific Expression of Splice Variants of Human IL-4 and IL-6 Gene mRNA. *Bull. Exp. Biol. Med.* **152**, 329–332 (2012).
162. Silva, A. L. & Romão, L. The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Letters* **583**, 499–505 (2009).
163. Kervestin, S. & Jacobson, A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 700–712 (2012).
164. Amrani, N. *et al.* A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**, 112–118 (2004).
165. Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Rehwinkel, J., Hilgers, V. & Izaurralde, E. A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* **26**, 1591–1601 (2007).
166. Eberle, A. B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R. Z. & Mühlemann, O. Posttranscriptional Gene Regulation by Spatial Rearrangement of the 3' Untranslated Region. *PLoS Biol* **6**, e92 (2008).