Université de Montréal

Impact du stress sur la survie des lymphocytes T CD8$^+$ mémoires dans le contexte des missions spatiales

par

Geneviève Dubeau Laramée

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Juin 2014

© Geneviève Dubeau Laramée, 2014

Résumé

La mémoire immunitaire permet à l'organisme de se souvenir de tous les agents pathogènes rencontrés afin de pouvoir monter une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace en cas de réinfection. Après la phase de contraction de la réponse primaire, les lymphocytes T CD8 mémoires survivent grâce à la présence de cytokines telle que l'interleukine 15 (IL-15). Ces cellules permettent aussi au système immunitaire de contrôler les virus latents n'ayant pas été totalement éliminés de l'hôte. Les situations de stress chronique affectent le système immunitaire provoquant la réactivation des virus latents. Des titres viraux élevés de virus de la famille *Herspeviridea* ont été observés chez les astronautes à leur retour de mission, suggérant que les hormones libérées en situation de stress auraient un impact négatif sur les lymphocytes T $CD8^+$ mémoires. Un modèle de stress chronique *in vitro* chez la souris a été élaboré en ajoutant de la corticostérone à des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires. Il a ainsi été démontré que l'hormone de stress avait un effet pro-apoptotique sur ces cellules et que cet effet était partiellement inhibé par l'IL-15. Des cibles moléculaires ont aussi été identifiées afin de suivre la fonction immunitaire mémoire lors des vols spatiaux à l'aide du cytomètre en flux Microflow1, une nouvelle plateforme portative de diagnostic biomédical. Les résultats des tests en laboratoire puis dans la Station Spatiale Internationale (SSI) démontrent qu'il sera possible de suivre la fonction immunitaire mémoire et les marqueurs de stress en temps réel lors des vols spatiaux.

Mots-clés **: lymphocytes T $CD8^+$ mémoires, stress, cytométrie en flux, vol spatial**

Abstract

The immune memory allows the body to remember all pathogens encountered in order to mount a faster and more effective immune response upon reinfection. After the contraction phase of the primary response, memory CD8 T cells survive in the presence of cytokines such as interleukin 15 (IL-15). These cells also allow the immune system to control latent viruses that were not completely removed from the host. Situations of chronic stress affect the immune system, causing the reactivation of these latent viruses. High viral titers of *Herpesviridea* family viruses were observed in astronauts upon their return, suggesting that hormones released under stress have a negative impact on memory CD8+ lymphocytes. An *in vitro* murine model of chronic stress has been developed by adding corticosterone to CD8+ memory T cells. It has been shown that the stress hormone had a pro-apoptotic effect on these cells and that this effect was partially inhibited by the addition of IL-15. Molecular targets have also been identified to monitor the memory immune function during spaceflight using the Microflow-1 cytometer, a new portable platform for biomedical diagnosis. The results of laboratory tests and the International Space Station (ISS) showed that it is possible to monitor the memory immune function and stress markers in real time during spaceflight.

Keywords**: CD8+ memory T cells, stress, flow cytometry, spaceflight**

Table des matières

Résumé i
Abstract ii
Table des matières iii
Liste des tableaux vi
Liste des figures vii
Liste des abréviations ix
Remerciements xiv
Introduction 1
Le système immunitaire 2
1.1. Origine des lymphocytes T $CD8^+$ 3
1.2. La réponse T $CD8^+$ primaire 7
1.2.1. Reconnaissance antigénique et molécules de costimulation 7
1.2.2. Phases de la réponse primaire 11
Expansion clonale et migration 11
Contraction 13
Différenciation des lymphocytes naïfs en cellules mémoires 15
1.3. La réponse T $CD8^+$ mémoire 17
1.3.1. Génération des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires effectrices et centrales 17
1.3.1.1. Voies de différenciation 17
1.3.1.2. Fonctions des sous-populations $CD8^+$ mémoires 22
1.3.2. L'homéostasie des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires 22
1.3.2.1. Cytokines nécessaires à l'homéostasie 23
1.3.2.2. Rôles des récepteurs de la famille du TNF 25
1.4. Rôle des lymphocytes $CD8^+$ mémoires dans la latence virale 29
1.4.1. Virus latents de la famille des Herpesviridae 29
1.4.2. Latence et réactivation virale 31
1.4.3. Contrôle de la réplication virale par le système immunitaire adaptatif 32
2. Le stress 34

2.1. Définition biologique 34
2.2. Réponse neuroendocrine au stress 35
2.3. Hormones de stress 37
2.3.1. Définitions et fonctions 37
2.3.1.1. Catécholamines 37
2.3.1.2. Glucocorticoïdes 38
2.4. Signalisation moléculaire des glucocorticoïdes 39
2.5. Impacts de la corticostérone sur le système immunitaire 42
2.5.1. Impacts des GCs sur les fonctions leucocytaires 42
2.5.1.1. Lymphocytes B et sécrétion d'anticorps 42
2.5.1.2. Cellules dendritiques 43
2.5.1.3. Cellules tueuses naturelles (NK) 43
2.5.1.4. Lymphocytes T 44
2.5.2. Cytokines et TNFRs 45
2.5.3. Réactivation virale 46
3. Le système immunitaire dans le contexte spatial 47
3.1. Impacts de la microgravité sur la physiologie humaine 47
3.1.1. Impacts sur le système cardiovasculaire 47
3.1.2. Impacts sur le système musculo-squelettique 49
3.1.3. Impacts sur le système immunitaire 50
3.1.3.1. Sous-populations leucocytaires 50
3.1.3.2. Hormones et cytokines 53
3.1.3.3. Réactivation virale 55
3.2. Diagnostic et suivi médical *in situ* 56
3.2.1. Modèles analogues pour l'étude des effets de la microgravité à bord de l'ISS 56
3.2.2. Plateformes de biodiagnostic existantes 59
3.2.3. Cytométrie en flux 60
Hypothèse et objectifs 62
Article Scientifique 1 63

Article scientifique 2 87
Discussion 98
Conclusion 105
Bibliographie 107
Annexe 1 129
Annexe 2 141

Liste des tableaux

Revue de littérature

Tableau 1 : Virus causant des infections latentes..... 31

Article scientifique 2

Table 1 : Performance of Microflow1 under different gravity levels 92

Table 2 : Comparison of white blood cells percentage measured with FACS Array and Microflow1 in normal and microgravity..... 93

Liste des figures

Revue de littérature

Figure 1 : Hématopoïèse 3
Figure 2 : Développement des lymphocytes T dans le thymus..... 5
Figure 3 Reconnaissance antigénique par le RCT 7
Figure 4 : Apprêtement et présentation de l'antigène par les CPA..... 8
Figure 5: Molécules de costimulation des lymphocytes T..... 9
Figure 6 : Contrôle par les cytokines γc et 4-1BB de la réponse et le maintien à long terme des lymphocytes T CD8+..... 10
Figure 7 : Structure des récepteurs de cytokines de la famille γc 14
Figure 8 : Changements phénotypiques lors de la différenciation des lymphocytes T CD8+..... 16
Figure 9 : Les récepteurs de la famille de l'IL-2 et leurs protéines STATs associées.. 19
Figure 10 : Composition et signalisation des récepteurs de la famille du TNF 27
Figure 11: Infection latente et persistante 29
Figure 12 : Réactivation des herpesvirus latents..... 32
Figure 13: Réponse du système nerveux central face à un stress 36
Figure 14 : Organisation du récepteur de glucocorticoïde alpha (GRα) 39
Figure 15 : Effets transactivateurs et transrépresseurs des glucocorticoïdes 41
Figure 16 : Impact de la microgravité sur la pression sanguine..... 48
Figure 17 : Études de suspension des membres inférieurs..... 57
Figure 18 : Modèles d'études de l'impact de la microgravité..... 58
Figure 19 : Paramètres d'un vol parabolique 59

Article scientifique 1

Figure 1 Corticosterone induces apoptosis in CD8 memory T cells..... 81
Figure 2 IL-15 inhibits CST-induced apoptosis in CD8 memory T cells in a dose-dependent manner. 82

Figure 3 Activation of STAT5 pathway in presence of corticosterone and increasing doses of IL-15. 83
Figure 4 IκBα expression is not affected by the presence of corticosterone or increasing doses of IL-15. 84
Figure 5 Expression of BIM_{EL} in central memory CD8 T cells in presence of corticosterone and increasing doses of IL-15..... 85
Figure 6 GITR surface expression on CD8 memory T cells is upregulated by IL-15 in a dose-dependent manner..... 86

Article scientifique 2

Figure 1 Microflow instrument and concept of fiber-optic flow cell 89
Figure 2 Benchmarking of Microflow1 with calibration beads 91
Figure 3 Analysis of a multiplexed Cytometric Bead Assay (CBA) 92
Figure 4 Discrimination of white blood cells (WBC) by Microflow1 93
Figure 5 Performance of Microflow1 in microgravity during parabolic flights 94
Figure 6 Location of the technology demonstration performed by Canadian astronaut Chris Hadfield on the ISS 95
Figure 7 Performance of the Microflow1 unit on the ISS..... 96

Liste des abréviations

A
ACTH : adrénocorticotrophine
AP-1 : protéine activatrice 1 (*activator protein 1*)
CPA : Cellule présentatrice d'antigène (*antigen presenting cells*)

B
BAFF : facteur activateur des cellules B
Bcl-2 : lymphome à cellules B 2 (*B-cell lymphoma 2*)
BCR : récepteur des lymphocytes B

C
CCR : récepteur de chimiokine de type X (*C-C chimiokine receptor type X*)
CD62L : L sélectine
CIS1 : protéine induite par les cytokines contenant un domaine SH2 (*Cytokine Inducible SH2-containing protein 1)*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus
CRH : corticotrophine
CSH : cellules souches hématopoïétique
CTL : Lymphocyte T cytotoxique (*Cytotoxic T Lymphocyte*)
CTLA-4 : antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (*Cytotoxic T-lympohcyte antigen 4*)

D
CD : Cellule dendritique (*Dendritic cell*)
DEX : dexaméthasone
DN : double négative
DP : double positive
DTH : hypersensibilité retardée

E
EBV : virus Epstein-Barr
EOMES : eomesodermine
EPO : érythropoïétine
ERK : kinase régulées par des signaux extracellulaires (*extracellular signal-regulated kinases*)
ESA : Agence Spatiale Européenne

G
GC : glucocorticoïde
GCR : récepteur des glucocorticoïdes
GITR : récepteur de la famille des TNF induit par les glucocorticoïdes
GM-CSF : facteur de stimulation de colonie des granulocytes et macrophages (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)*
GRE : élément de réponse aux glucocorticoïdes

H
HPA : axe hypotalamique-pituitaire-adrénale
HSP : protéine de choc thermique (*Heat Shock protein*)
HSV1/HSV2 : virus de l'herpes de type 1 et type 2

I
ICOSL : ligand costimulateur inductible de la cellule T (*Inducible T-cell Costimulator Ligand)*
ID2/ID3 : inhibiteur de liaisons à l'AND (*DNA-binding protein inhibitor ID)*
IFNγ : Interféron gamma (γ)
IL-10 : Interleukine 10
IL-12 : Interleukine 12
IL-15 : Interleukine 15
IL-2 : Interleukine 2
IL-21 : Interleukine 21
IL-4 : Interleukine 4
IL-7 : Interleukine 7
IL-9 : Interleukine 9

J
JAK1/JAK3 : tyrosine janus kinase

K
KLRG-1 : récepteur 1 de sous-type G de mort cellulaire ressemblant à une lectine (*Killer cell Lectin-like receptor subfamily G member 1*)

L
LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire
LSP1 : protéine spécifique aux lymphocytes 1 (*Lymphocyte-specific protein 1*)

M
MFI : intensité de fluorescence moyenne

MPEC : cellules effectrices précurseurs des mémoires (*memory precursor effector cells*)

N

NASA : Administration Nationale de l'Aéronautique et de l'Espace
NF-κB : facteur de transcription nucléaire kappa B (*Nuclar factor-kappa B*)
nGRE : élément négatif de réponse aux glucocorticoïdes
NK : tueuse naturelle (*natural killer*)

P

PBMCs : cellules mononuclées périphériques du sang
PD-L1 : ligand 1 du récepteur de mort programmé 1 (*Pgraommed cell death 1 ligand 1*)

R

RE : Réticulum endoplasmique

S

SLEC : cellules effectrices à courte durée de vie (*short-lived effector cell)*
SNS : système nerveux sympathique
SOCS: suppresseurs de la signalization des cytokines
SSI : inhibiteur des STAT induit par les STAT (*STAT induced STAT inhibitors*)
SSI : Station Spatiale Internationale
STAT1-6: signal traducteur et activateur de la transcription 1-5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1-6*)

T

TAP : Transporteur associé à l'apprêtement de l'antigène
T_{aux} : Lymphocyte T auxiliaire
T-bet : facteur de transcription T-box 21
Tcm : Lymphocyte T mémoire central
RCT : complexe du récepteur T (*T cell receptor*)
Tem : Lymphocyte T mémoire effecteur
TGF-β : Facteur de croissance de transformation bêta (*Transforming Grow Factor beta*)
TNFR : récepteur du facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor Receptor*)
TNFα : Facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor alpha*)
TRAF2 : facteur associé au récepteur du TNF 2 (*TNF Receptor associated factor 2*)
TRAIL : ligand induisant l'apoptose associé au TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)
T_{reg} : Lymphocyte T régulateur

V

VZV : virus de la varicelle-zona

À Nicolas, l'homme de ma vie,
tu auras été mon Soleil
lorsque je ne voyais que des trous noirs

Remerciements

Tout d'abord, je ne remercierai jamais assez mon superviseur Luchino Cohen ainsi que mon cosuperviseur Laurent Sabbagh pour la chance qu'ils m'ont donnée en me transmettant leur talent, leur expertise et leur passion pour les sciences de la vie. Œuvrant tous deux dans des milieux scientifiques différents, ils m'auront fait découvrir tous les bons – et moins bons côtés – de la recherche fondamentale et appliquée. Grâce aux Drs. Cohen et Sabbagh j'ai défini et peaufiné mon intérêt pour la recherche et découvert que je ne pourrais pas passer ma vie loin d'un laboratoire! Merci d'avoir cru en moi, même les jours où moi-même je n'y croyais plus tellement. Merci d'avoir fait de moi une meilleure scientifique ainsi qu'une chercheuse plus expérimentée. Je poursuivrai toujours mon cheminement en me rappelant à quel point vous avez été patient et compréhensif tout au long de ce processus. Merci mille fois.

Merci à l'équipe de l'Institut National d'Optique (INO) et tout particulièrement à Christophe Rivière et Ozzy Mermut pour m'avoir inclus dans ce projet fantastique et innovateur de cytométrie spatiale. Ils m'ont permis de découvrir une autre facette de la recherche et du développement en sciences. Ils auront été des collaborateurs essentiels et plus qu'agréables dans ce fantastique projet et je crois fermement en leur capacités d'amener le Microflow vers de nouveaux univers.

Merci au département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal d'avoir subventionné mon projet tout au long de ma maîtrise. Merci à Nathalie Labrecque, ma marraine de maîtrise, de m'avoir accompagné et aidé dans ce cheminement scientifique ainsi que pour la lecture des centaines de pages à suivre! Merci à Jacques Thibodeau, membre de mon comité d'évaluation et un de mes premiers enseignants universitaires m'ayant donné le goût de l'immunologie.

Merci à Nicolas Cermakian et toute son équipe de m'avoir donné ma première chance dans le milieu de la recherche scientifique malgré mon statut d'étudiante en rédaction. J'espère bien lancer ma carrière en recherche, faire un bon bout de chemin et m'épanouir et dans ce laboratoire captivant.

Merci à ma mère qui collectionne mes résultats de recherche et relis toutes mes publications malgré le fait qu'elle n'y comprenne pratiquement rien. Merci à mon père qui est

tellement fier du chemin que j'ai parcouru – mais qui sera drôlement content que j'en finisse! Merci aux membres de ma famille qui ne sont pas encore tout à fait certains si je deviendrai astronaute un de ces jours, mais qui m'encouragent sans arrêt. Merci à Jean-Marie, un de mes plus grands fans même s'il croit toujours que je devrais devenir médecin. Un merci tout particulier à Frédéric et Caroline, je n'aurais pas pu trouver de meilleurs amis que vous même si j'avais fait le tour de toutes les galaxies.

Finalement le plus grand des mercis à Nicolas, qui m'a aimé indéfectiblement du début à la fin, qui m'a ramené à la réalité bien des fois et qui a su me donner la dernière poussée nécessaire à l'achèvement de ce travail.

Introduction

Le système immunitaire

Les cellules du système immunitaire permettent de reconnaître spécifiquement et ainsi de répondre adéquatement à tous les éléments étrangers qu'ils rencontrent dans l'organisme. Lorsqu'il reconnaît un élément étranger au soi, le système immunitaire produit une réponse effectrice visant à éliminer celui-ci le plus rapidement et efficacement possible. Cette défense possède deux voies de réponse : la réponse innée et la réponse adaptative (Kindt et al., 2007). En quelques heures seulement, les récepteurs de l'immunité innée peuvent identifier des groupes de molécules d'origine microbienne et éliminer le microbe pathogène. Toutefois, lorsque la menace réussit à franchir les barrières innées et établir une infection, l'immunité adaptative prend le dessus. Cette réponse plus tardive possède une plus grande spécificité antigénique et permet une discrimination du soi beaucoup plus précise. Les lymphocytes B et T sont les principaux acteurs de la réponse adaptative et coopèrent afin de monter une réponse immunitaire contre un pathogène ciblé.

Les lymphocytes B sécrètent des anticorps lorsqu'ils reconnaissent un antigène alors que les lymphocytes T permettent d'éliminer toutes cellules présentant leur antigène spécifique suite à leur activation. L'atout majeur de cette réaction est l'établissement d'une mémoire immunitaire une fois la menace éliminée. L'activation des lymphocytes par un antigène va conduire à la production de cellules mémoires spécifiques et permettre une reconnaissance plus rapide si l'hôte devait se trouver infecté à nouveau par le même microorganisme. La réponse immunitaire secondaire serait alors plus rapide et plus efficace.

1.1. Origine des lymphocytes T CD8$^+$

Toutes les cellules du système immunitaire proviennent des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules se différencient dans la moelle osseuse en précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes menant ultimement aux globules rouges et blancs du sang. La lignée lymphoïde mène à la différenciation des lymphocytes B ou aux sous-populations de cellules T et NK. Les lymphocytes B vont terminer leur maturation dans la moelle osseuse alors que les précurseurs lymphoïdes T vont migrer vers le thymus afin de terminer leur développement (Figure 1)

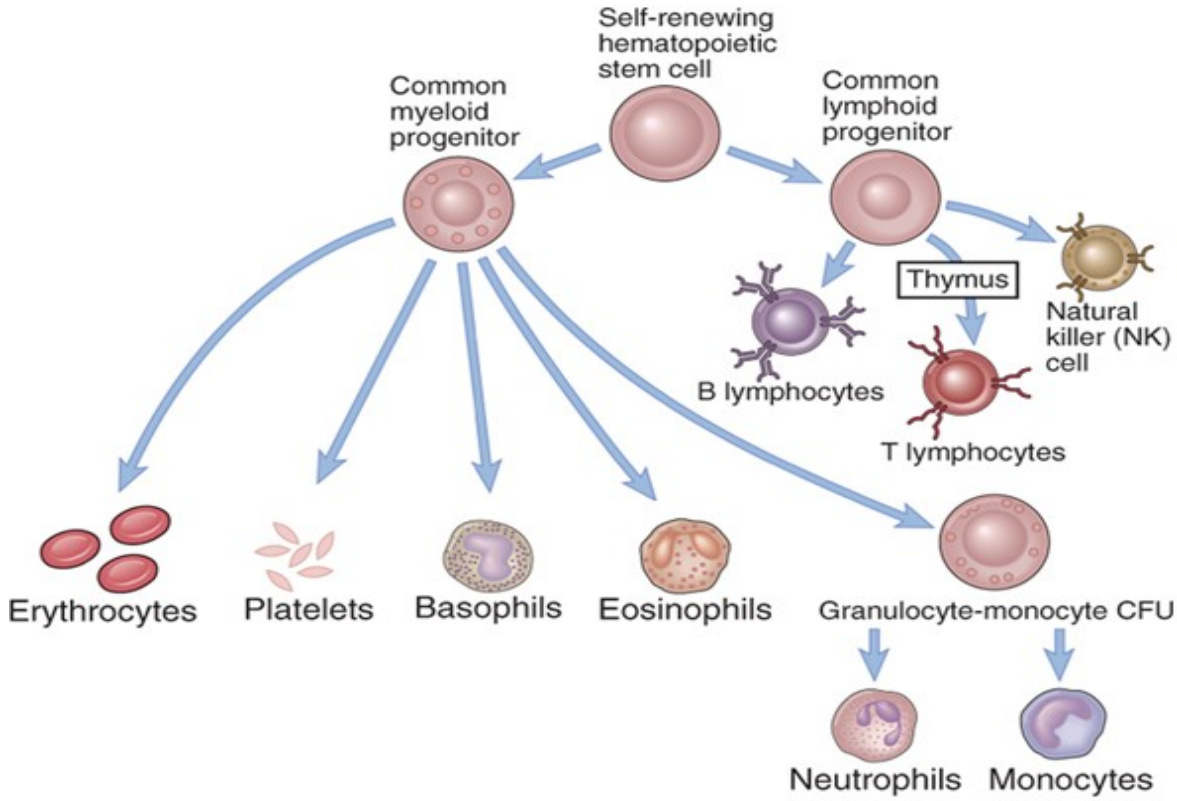


Figure 1 : Hématopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques mènent à la production de toutes les cellules sanguines humaines. Elles vont se différencier en cellules progénitrices myéloïdes ou lymphoïdes qui généreront, respectivement, les globules rouges du sang (érythrocytes, platelettes, basophiles, éosinophiles et granulocytes) et les leucocytes (lymphocytes B, lymphocytes T et cellules tueuses naturelles (NK)). Modifiée de (Abbas et al., 2007)

Le thymus est un organe lymphoïde primaire dont le rôle principal est de générer un répertoire de lymphocytes T suffisamment diversifié pour reconnaître tous les éléments étrangers au soi et assez spécifiques pour ne pas considérer les éléments du soi comme dangereux. Lors de leur entrée dans le thymus, les précurseurs des lymphocytes T ne possèdent pas encore les molécules de surfaces caractéristiques des cellules différenciées telles que le complexe du récepteur T (RCT) ou les co-récepteurs CD4 ou CD8. Ces cellules sont dites « doubles négatives » (DN) et effectueront le réarrangement de la chaîne RCTβ et la formation du pré-RCT avant de progresser vers l'état de double positif (DP) où elles expriment à la fois le CD4 et le CD8 en surface. Les thymocytes DN entrent dans une phase accrue de prolifération avant de subir la sélection positive puis négative (figure 2).

Avant les étapes de sélection, les thymocytes vont subir un réarrangement des gènes variables (V), gènes de diversité (D) et des gènes de jonction (J) de leur ADN. Cette recombinaison permet de produire une immense variété de RCT afin de permettre une reconnaissance adéquate de tous les antigènes étrangers possibles. Plus spécifiquement, la chaîne beta des lymphocytes sera réarrangée en joignant d'abord les segments D et J puis en les combinant à un segment V. Cette chaîne s'associe alors à la pseudo-chaîne alpha afin de former le pré-RCT et cette association initie le réarrangement de la chaîne alpha. Cependant, ce réarrangement concerne seulement les domaines V et J. La traduction de ces gènes permettra de produire les protéines RCTα qui se lieront avec la chaîne β afin de former le RCT final et fonctionnel de la majorité des lymphocytes T.

La sélection positive permet de distinguer les thymocytes possédant un récepteur pouvant reconnaitre les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMHI/CMHII). Cette fonction du thymus permet de ne sélectionner que les précurseurs des lymphocytes T ayant un réarrangement du RCT fonctionnel et d'éliminer par apoptose ceux n'ayant pas répondu aux molécules du CMH. Les thymocytes ayant survécu à la sélection positive rencontreront ensuite des cellules dendritiques et des macrophages portant un CMH de classe I ou II portant ou non un antigène du soi. Les cellules T ayant une affinité trop élevée pour un complexe antigène/CMH seront éliminées par apoptose alors que les autres progresseront vers un stade simple positif $CD4^+$ ou $CD8^+$ selon que le RCT se lie à des complexes antigène/CMHII ou antigène/CMHI respectivement. À ce

stade, les lymphocytes T simples positifs ayant survécu à la sélection négative possèdent tous un complexe membranaire RCT-CD3 unique et fonctionnel ainsi qu'un corécepteur CD4 ou CD8 permettant la liaison spécifique au CMH. Ils migrent alors vers la médulla thymique puis entreront dans la circulation sanguine. Ils circuleront jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires soit les ganglions lymphatiques et la rate d'où ils pourront reconnaître les antigènes étrangers et initier une réponse immunitaire primaire.

Les lymphocytes T CD4+ se divisent en deux catégories permettant de réguler

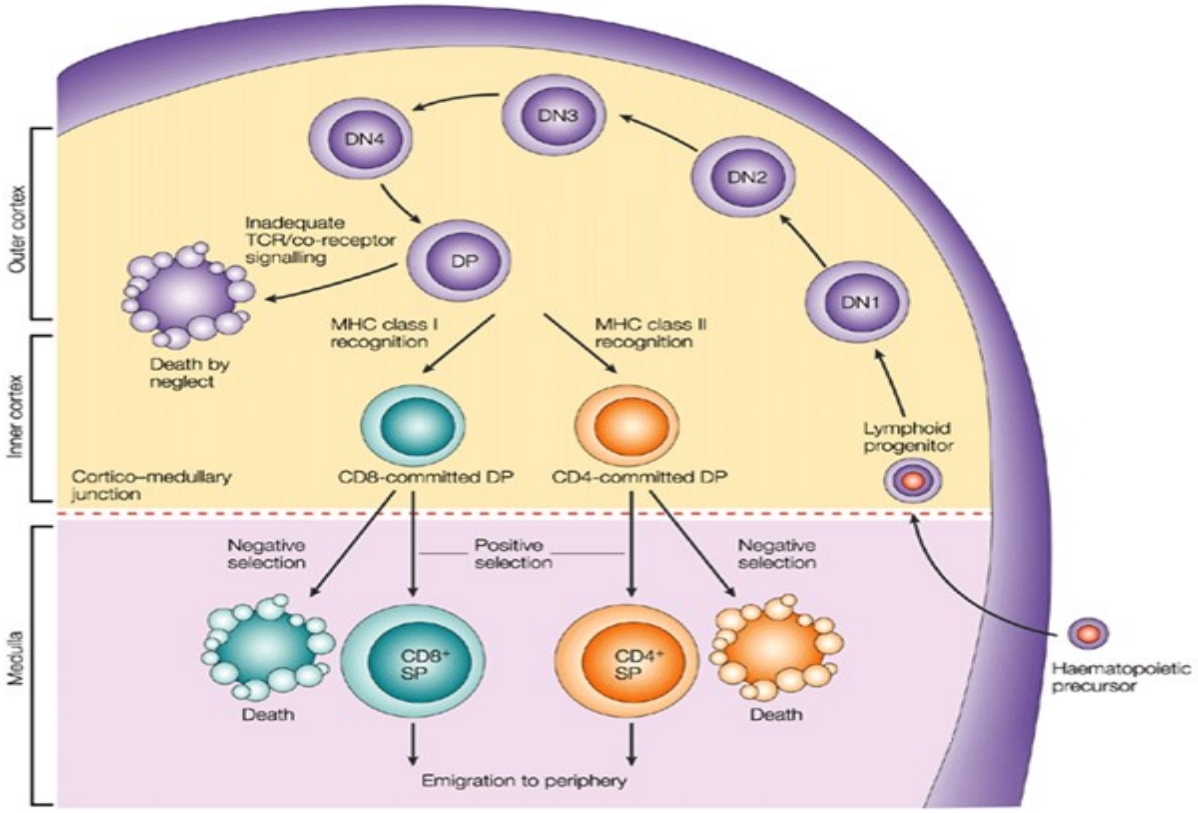


Figure 2 : Développement des lymphocytes T dans le thymus.

Les cellules lymphoïdes progénitrices migrent de la moelle osseuse vers le thymus afin de terminer leur maturation. Ces cellules sont nommées thymocytes doubles négatifs (DN1-4) car ils n'expriment ni le RCT ni les corécepteurs CD4 ou CD8. Les thymocytes DN vont traverser 4 étapes de maturation afin de réarranger les chaines α et β du RCT jusqu'au stade double positif où ils expriment le RCT de même que le CD4 et le CD8 à leur surface. Les thymocytes DP seront mis en contact avec des cellules exprimant le CMHI ou CMHII et présentant différents peptides antigéniques du soi. Les thymocytes DP ne réagissant pas suffisamment à la présentation antigénique mourront par négligence et ceux réagissant trop fortement subiront une sélection négative (mort par apoptose). Les thymocytes DP répondant au CMHI deviendront des lymphocytes CD8+ alors que ceux répondant au CMHII deviendront simple positifs pour le CD4. Ces cellules simples positives pourront ensuite émigrer du thymus vers la périphérie. ***Modifiée de (Germain, 2002).***

positivement ou négativement la réponse immunitaire. Ces lymphocytes sont dits auxiliaires (*lymphocytes T helper* (T_{aux})) puisqu'ils permettent d'activer de nombreux autres acteurs immunitaires lorsqu'ils sont activés en plus de produire des cytokines essentielles à la réponse. Ils reconnaissent des complexes peptides antigéniques/CMHII à la surface des CPA, ce qui permet la prolifération des lymphocytes B ainsi que la production d'anticorps. Les lymphocytes T CD4+ peuvent être divisés en deux sous-catégories ayant des rôles différents dans la réponse immunitaire. La première, les lymphocytes T_H1, répondent à des infections bactériennes intracellulaires et peuvent aussi être responsables du maintien des réponses auto-immunes. Elles produisent des cytokines proinflammatoires dont l'IFNγ, l'IL-2 et le TNFα menant à l'activation des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes B (Shiku, 2003). La seconde sous-catégorie soit les T_H2, produit de l'IL-4, 5, 6, 10 et 13, des cytokines impliquées entre autre dans l'infection parasitaire extracellulaire, les réactions allergiques et l'activation des cellules associées tel que les éosinophiles. Ces lymphocytes T CD4+ stimulent principalement l'activité des lymphocytes B dans la production d'anticorps. Il existe aussi une population de lymphocytes T exprimant le CD25 en plus du corécepteur CD4. Ces cellules dites régulatrices (Treg) jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'auto-immunité en régulant l'activité des lymphocytes T auto-réactifs et en produisant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF-β (Geginat et al., 2013).

La réponse immunitaire cytotoxique est assurée par les lymphocytes T CD8+ activés. Ils produisent des cytokines pro-inflammatoires et sécrètent des molécules cytotoxiques (Andersen et al., 2006). Les CTL (*cytotoxic T lymphocytes*) participent à l'élimination directe des cellules infectées et tumorales mais et ils peuvent aussi éliminer l'infection cytoplasmique sans systématiquement tuer les cellules grâce à la production d'IFNγ et de TNFα (Andersen et al., 2006). Une partie de cette sous-population lymphocytaire se différencie en lymphocytes mémoires spécifiques à l'antigène à la fin de la réponse primaire. À la suite d'une réponse immunitaire, des lymphocytes T CD8+ et CD4+ mémoires survivent et persisteront pour toute la durée de vie de l'hôte afin de le protéger contre une réinfection.

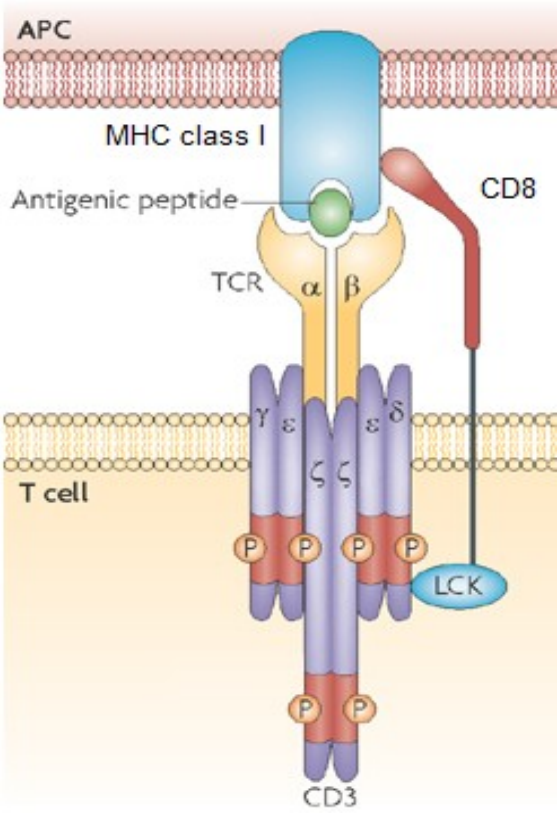
1.2. La réponse T CD8$^+$ primaire

1.2.1. Reconnaissance antigénique et molécules de costimulation

La reconnaissance antigénique par le RCT est la première étape menant à l'activation, à la prolifération clonale puis à la différenciation des lymphocytes T. Ils diffèrent d'ailleurs des lymphocytes B de par leur façon de reconnaître les antigènes microbiens. En effet, les lymphocytes T CD8$^+$ vont reconnaître un peptide antigénique de 8 à 10 acides aminés associé au CMHI exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) En plus de l'association spécifique antigène-RCT/CD3, la liaison au corécepteur CD8 est essentielle à la reconnaissance antigénique par les lymphocytes CD8 naïfs. La molécule CD8 constituée des chaînes α et β reliée par un pont disulfure se lie à la chaîne α du CMHI, permettant la signalisation par le RCT (figure 3).

Figure 3 Reconnaissance antigénique par le RCT

Le récepteur des cellules T (RCT) entre en contact avec le complexe majeur d'histocompatiblité de classe 1 (CMH1) présentant un peptide antigénique à sa surface. Le corécepteur CD8 permet la stabilisation du complexe ainsi que l'activation complète du lymphocyte en recrutant les molécules effectrices de la cascade de signalisation telles que la kinase LCK. APC : antigen presenting cell. ***Modifiée de (Gascoigne, 2008)***



Les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (CD) sont des CPA spécialisées puisqu'elles expriment à la fois le CMHI et CMHII ainsi que les molécules de costimulation telles que B7 (CD80/CD86) ou CD40, deuxième signal essentiel à l'activation lymphocytaire. Les molécules de classe I du CMH, constitué d'une chaîne α et β_2-microglobuline, est exprimé de façon ubiquitaire par les cellules nucléées et s'associe à des peptides antigéniques en provenance du cytosol des cellules. Ces peptides sont produits par le protéasome qui fragmente les protéines en peptides qui seront ensuite transporter dans le réticulum endoplasmique (RE) par des transporteurs associés à l'apprêtement de l'antigène (TAP1 et TAP2) (Andersen et al., 2006; Villadangos and Schnorrer, 2007). Une fois dans la lumière du RE, le peptide antigénique devra se lier à la chaîne alpha du CMHI avant que le complexe ne soit exprimé à la surface cellulaire (Figure 4A). Une seconde voie permet plutôt de présenter des peptides exogènes phagocytés par les CPA à leur surface toujours grâce aux molécules du CMHI (Figure 4B).

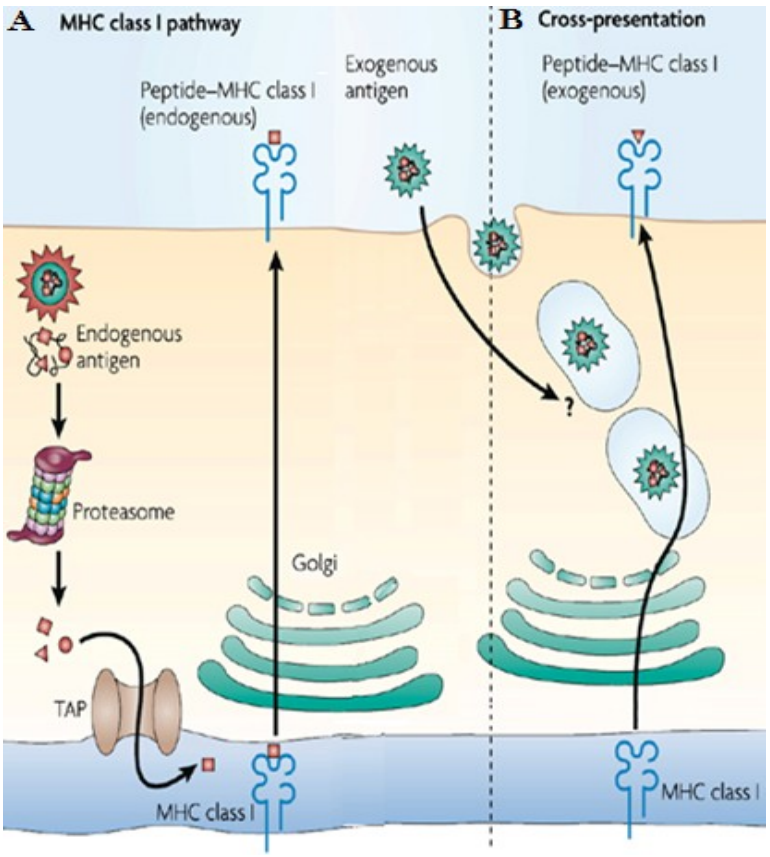


Figure 4 : Apprêtement et présentation de l'antigène par les CPA

Les molécules du CMHI présentent des peptides ayant été dégradés dans le cytosol. Ces peptides peuvent provenir de molécules endogènes ou exogènes ayant été endocytées par la cellule. Ces molécules sont ensuite digérées par la cellule puis présentés aux lymphocytes T CD8+ par une molécule du CMHI à leur surface. ***Modifiée de (Villadangos and Schnorrer, 2007)***

Un second signal médié par la liaison du CD28 ou des membres de la famille des récepteurs du TNF permet une activation complète des lymphocytes T CD8+. Les membres de la famille du CD28 sont caractérisés par un domaine Ig extracellulaire ainsi qu'un court domaine cytoplasmique (Kindt et al., 2007). Ces récepteurs représentés à la figure 5 sont exprimés à la surface des cellules T CD8+ et se lient à leurs ligands respectifs à la surface des CPA. L'absence de costimulation plonge le lymphocyte dans un état d'anergie où il ne peut plus répondre à l'antigène même s'il est spécifique ou représenté à nouveau en présence de costimulation. Les ligands des membres de la famille CD28 sont des protéines de la famille B7 comprenant entre autres B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), ICOSL (*Inducible T-cell Costimulator Ligand*) et PD-L1 (*Programmed cell death 1 ligand 1*) et se liant respectivement au CD28, CTLA-4, ICOS et PD-1. La signalisation via la liaison CD28/B7 induit un signal de costimulation positif essentiel à la réponse adaptative T puisque la liaison du TCR ou du CMH sans cette costimulation provoque l'anergie de la cellule ((Bertram et al., 2004; Croft, 2003b)).

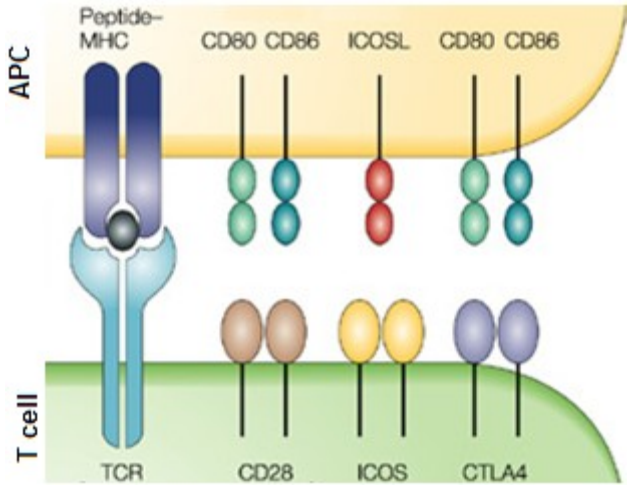


Figure 5: Molécules de costimulation des lymphocytes T
La molécule de costimulation CD28 permet d'induire l'expression d'autres récepteurs de costimulation permettant l'activation et la survie des lymphocytes T tel qu'ICOS et CTLA4. ***Modifiée de (Acuto and Michel, 2003)***

Un rôle de costimulation a aussi été attribué aux membres de la famille du TNF, dont le récepteur 4-1BB (CD137) (figure 6). Ce récepteur est exprimé de façon maximale au pic de la réponse primaire soit environ 48h après stimulation pour ensuite être internalisé après 4 à 5 jours (Vinay and Kwon, 1998). Son expression a été corrélée avec celle du CD69, marqueur d'activation, ainsi que précédant l'expression élevée du CD44, marqueur fréquemment utilisé pour identifier les cellules mémoires effectrices. Il a été établi que 4-1BB jouait un rôle important dans la réponse cytotoxique primaire puisque les souris ne possédant pas le ligand de 4-1BB (4-1BBL$^{-/-}$) démontrent une diminution significative de la prolifération des lymphocytes T CD8+ à la suite d'une infection avec le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Tan et al., 1999). Il a aussi été démontré que la liaison de 4-1BBL à son récepteur joue un rôle de costimulation et empêche la mort des lymphocytes T induite par l'activation (Hurtado et al., 1997). Cependant, un rôle fondamental pour 4-1BB a été découvert

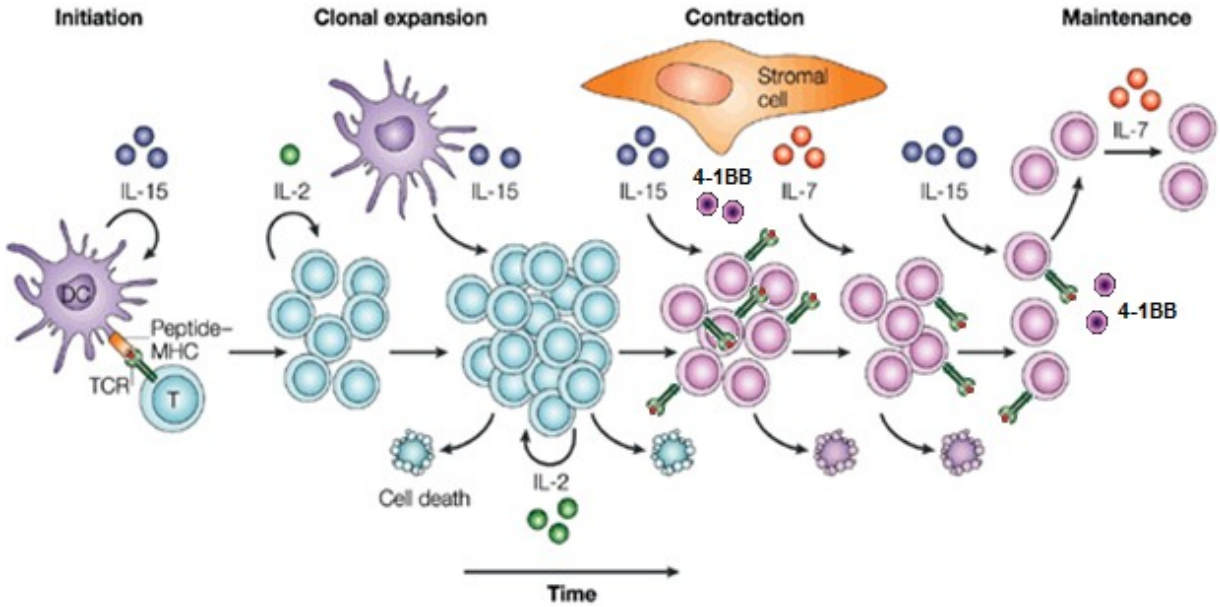


Figure 6 : Contrôle par les cytokines γc et 4-1BB de la réponse et le maintien à long terme des lymphocytes T CD8+

Les cytokines et les membres de la famille du TNFR peuvent affecter la prolifération et la survie des lymphocytes T CD8+ à toutes les étapes de la réponse adaptative. L'IL-2 et l'IL-15 permettent la prolifération clonale des cellules spécifiques à l'antigène après l'activation par le RCT. L'IL-7, l'IL-15 et le 4-1BB permettent à certaines cellules T CD8+ de survivre à la phase de contraction et de se différencier en cellules mémoires. Ces dernières permettent aussi le maintien homéostatique des lymphocytes T CD8+ mémoires après l'élimination complète de l'antigène. ***Modifiée de (Schluns and Lefrancois, 2003)***

dans la survie des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires.

Une fois pleinement activés, les lymphocytes T CD8+ sont des éléments critiques de la réponse adaptative primaire et peuvent lyser directement les cellules infectées ou libérer des cytokines contribuant à réduire la réplication virale. Ces lymphocytes permettent aussi d'éliminer les cellules dysfonctionnelles, telles que les cellules cancéreuses, et préviennent aussi le développement de maladies auto-immunes. Leur activation et leur survie joue donc un rôle clé dans le développement de la mémoire immunitaire.

1.2.2. Phases de la réponse primaire

Expansion clonale et migration

Lorsqu'une CD est infectée ou phagocyte un pathogène, elle amorce un processus d'activation et de maturation et augmente l'expression du CMHI, des molécules de costimulation ainsi que des récepteurs de chémokines afin de migrer vers les tissus lymphoïdes secondaires où elle présente l'antigène aux lymphocytes T CD8+ naïfs présents. Afin de pleinement induire une réponse adaptative médiée par les cellules cytotoxiques, les CPA doivent fournir trois signaux essentiels. Les deux premiers décrits précédemment concernent la présentation de l'antigène via la liaison peptide/CMH au RCT ainsi que le signal de costimulation menant à l'activation complète du lymphocyte. Un troisième signal important est le signal généré par la liaison de certaines cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-2, l'interleukine 12 ou l'interferon de type I avec leur récepteur à la surface des lymphocytes. Ces-derniers, une fois activés, secrètent de l'IL-2 afin de promouvoir leur propre activation. Une phase d'expansion clonale suivra l'activation et la population de lymphocytes T CD8+ antigène-spécifique pourra se diviser jusqu'à 19 fois durant la première semaine suivant l'infection (Badovinac et al., 2007). Le cycle cellulaire s'accélère et la chaîne α du récepteur de l'IL-2 apparaît à la surface membranaire du lymphocyte CD8+. Les lymphocytes T CD8+ activés deviennent des CTL reconnaissables par leur production élevée d'IFNγ, de TNF, d'IL-2, de perforine et de granzyme B. Ces CTL quittent les

tissus lymphoïdes périphériques à la recherche des cellules cibles à détruire dans les tissus infectés. Pour ce faire, l'expression des molécules guidant leur migration et leur adhésion est modifiée à la surface cellulaire. La L-sélectine (CD62L) et le récepteur de chimiokine de type 7 (CCR7) sont des molécules permettant la localisation aux ganglions lymphatiques alors que les récepteurs de chimiokines CCR2 et CCR5 permettent la migration aux tissus enflammés. Ainsi, les CTL acquièrent un phénotype $CD62L^{lo}/CCR7^{-}/CCR5^{+}$ (Weninger et al., 2001). Des molécules d'adhésion telle que LFA1 (CD11a) sont aussi exprimées et permettent l'extravasation des CTL dans les tissus infectés lors de leur liaisons aux molécules ICAM-1 à la surface endothéliale. D'autres adressines, telles que le CD34 ou GLYCAM1, sont exprimés sur l'endothélium des ganglions lymphatiques et permettent l'entrée des lymphocytes en se liant au CD62L exprimé à leur surface. Par la suite, il existe trois méthodes par lesquelles un lymphocyte T cytotoxique activé peut tuer une cellule cible. La première implique la liaison du ligand de Fas (Fas-L), exprimé à la surface des CTL activées, à son récepteur (Fas) à la surface des cellules cibles. Cette liaison induit une cascade de signalisation menant à l'apoptose induite par l'activation des caspases 8 et 3 (Nagata, 1997). Une deuxième méthode directe menant à l'apoptose de la cellule infectée est la sécrétion par les lymphocytes cytotoxiques de perforine qui s'insère dans la membrane de la cellule cible et y forme un canal permettant aux granzymes d'entrer dans le cytoplasme. Encore une fois, ces petites protéines cytotoxiques provoquent l'activation de la voie des caspases mais peuvent aussi provoquer la mort cellulaire directement en dégradant l'ADN ou des protéines telles que Bid, menant au recrutement des cellules proapoptotiques Bax ou Bak (Heibein et al., 2000; Trapani and Smyth, 2002). Finalement, les CTL peuvent tuer leurs cibles par la sécrétion de TNFα et IFNγ. Le TNFα, en se liant à son récepteur, peut induire l'apoptose par la voie classique d'activation de la caspase 3 alors que l'IFNγ augmente la présentation de peptides endogènes par le CMHI de la cellule cible, augmentant la possibilité de reconnaissance et de lyse par les CD8+. De plus, cette cytokine augmente l'expression de Fas par la cellule cible menant aussi à l'apoptose par la liaison Fas/FasL et l'activation de la cascade de signalisation des caspases. (Andersen et al., 2006; Russell et al., 2009).

Contraction

Lorsque l'élément étranger est éliminé de l'organisme la réponse adaptative doit s'arrêter afin d'éviter une réponse inflammatoire et cytotoxique chronique et ainsi restaurer l'homéostasie cellulaire chez l'hôte. Les CTL entrent donc dans une phase de contraction où environ 90% d'entre elles vont mourir par apoptose alors que les 10% restant poursuivront leur différenciation vers un phénotype mémoire et une survie à long terme. Plusieurs signaux sont nécessaires à la phase de contraction : l'expression du CTLA-4, les cytokines de la famille du récepteur à chaine γ (γc), certaines molécules de la famille du TNFR ainsi que les molécules apoptotiques de la famille Bcl-2.

La molécule CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) est un membre de la famille du CD28 exprimé sur les CTL activées(Greenwald et al., 2002). Cette molécule possède une plus grande affinité de liaison avec la molécule B-7 que le CD28 mais, contrairement au CD28, elle mène à l'inhibition de la signalisation via le RCT. Ainsi, l'absence de CTLA-4 mène à une sortie précipitée de la phase G1 et l'entrée dans une phase S significativement prolongée, augmentant la prolifération des lymphocytes T, ce qui démontre le rôle essentiel de cette molécule dans l'arrêt de la répons adaptative (Greenwald et al., 2002). De plus, le CTLA-4 diminue la production de cytokines dont principalement l'IL-2 et son récepteur (Alegre et al., 1998) en plus de diminuer l'expression des facteurs de transcription nécessaire à la division et à la survie cellulaire tels que NF-κB et AP-1 (Harlin et al., 2002).Les récepteurs des cytokines de la famille γc ont toutes en commun la chaîne γ. Ce groupe comprend l'IL-2, -4, -7, -9, -15 et -21 dont la structure de leur récepteur est illustrée à la figure 7. Puisque ces cytokines peuvent inhiber l'apoptose et stimuler la prolifération cellulaire, il a été suggéré que la fin de la réponse primaire diminuait leur expression et donc permettrait la contraction lymphocytaire par manque de facteurs de croissance (Rubinstein et al., 2008). Entre autres, il a été observé que la mort des cellules CD8+ LCMV-spécifiques par épuisement pouvait être retardée par l'administration d'IL-2 chez la souris et que l'administration d'IL-7 et d'IL-15 augmentait le nombre de cellules spécifiques de l'antigène *in vivo* (Akbar et al., 1996; Tan et al., 2001; Vella et

al., 1998). De plus, il a été démontré que l'IL-7 induisait l'expression des membres de la famille de Bcl-2, inhibant l'activité proapoptotique de Bim (Carrio et al., 2007; Schluns et al., 2000).

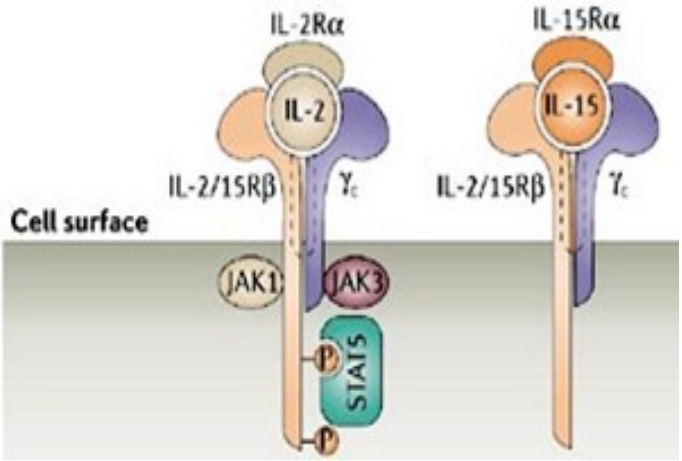


Figure 7 : Structure des récepteurs de cytokines de la famille γc

Les récepteurs des cytokines interleukine-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 sont tous composés de la chaîne γ. Les récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15 possèdent en plus une chaîne commune nommée beta (β) ainsi qu'une chaîne alpha unique (IL-2Rα et IL-15Rα). Une fois liée à sa cytokine spécifique, le récepteur peut être phosphorylée et mené à l'activation de différentes cascades de signalisation telle que celles des STATs. ***Modifiée de (Waldmann, 2006)***

La phase de contraction à la suite de la réponse adaptative primaire implique l'induction des voies d'apoptose médiées par les caspases. Le modèle intrinsèque implique un équilibre entre les membres pro- et antiapoptotique de la famille Bcl-2. Cette voie de signalisation nécessite la sécrétion de cytochrome c depuis la mitochondrie et l'activation de la caspase 9 qui déclenche l'apoptose (Brentnall et al., 2013; Cepero et al., 2005; Slee et al., 1999). Par exemple, l'inactivation de Bim, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, a démontré que la contraction des cellules T CD8+ activées à la suite d'une infection avec un virus de l'herpes était réduite (Grayson et al., 2006). Ainsi, les membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 sont nécessaires à la contraction suite à une réponse immunitaire primaire. Les membres de la famille du TNF, en plus d'être des molécules de costimulation importantes, jouent aussi un rôle dans la phase de contraction des cellules effectrices. En effet, les molécules Fas, CD40 et TRAIL ainsi que leurs ligands ont été identifiés comme

induisant la voie extrinsèque de l'apoptose induisant leurs effets via l'activation de la caspase 8 lors de la phase de contraction (Wang and El-Deiry, 2003; Weant et al., 2008).

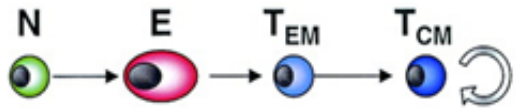
Différenciation des lymphocytes naïfs en cellules mémoires

La voie de différenciation des lymphocytes T CD8+ naïfs menant à la formation des cellules mémoires a été un sujet très controversé. À l'heure actuelle, le modèle impliquant une forme de différenciation progressive linéaire est une des voies de création des lymphocytes T CD8+ mémoires envisagée par la communauté scientifique (Opferman et al., 1999; Sallusto et al., 2004; Wherry et al., 2003). Ainsi, les cellules T CD8+ matures protégeant l'organisme peuvent être séparées en 4 groupes selon leur phénotype : naïf, effecteur, mémoire effecteur (Tem) et mémoire central (Tcm). Ces différentes populations lymphocytaires peuvent être identifiées selon leur fonction et leurs marqueurs phénotypiques et progresseraient d'un phénotype à l'autre de façon linéaire (figure 8).

La différenciation entre les cellules naïves, effectrices et mémoires peut être effectuée en se basant sur l'expression des corécepteurs CD28 et CD27 de même que l'isoforme de CD45, CD45RA ou CD45RO. Ainsi, les cellules T CD8+ naïves expriment le CD27 et le CD28 de même que l'isoforme CD45RA (Chen, 2013; Kindt et al., 2007). Cependant, ces mêmes cellules devenues mémoires expriment plutôt le CD45RO. Le CD45RO permet un meilleur arrimage du RCT avec ses corécepteurs que la forme CD45RA (Tomiyama et al., 2002), ce qui explique la capacité des cellules mémoires à induire une réponse immunitaire secondaire sans la présence de tous les autres signaux nécessaires à la réponse antigénique primaire, lui conférant un avantage en termes de temps d'action et d'efficacité immunitaire. Les cellules T effectrices présentent un phénotype où il n'y a pas d'expression du CD27 ainsi que du récepteur de localisation aux ganglions lymphatiques CCR7. Ainsi, il est possible de distinguer les naïves et mémoires CCR7+ présentent dans les ganglions, des cellules effectrices des tissus lymphatiques CCR7-. D'un côté plus fonctionnel, les cellules naïves et

mémoires peuvent être différenciées des cellules effectrices de par leur expression faible d'IFNγ, de perforine et de granzyme B.

Afin de permettre leur survie, les lymphocytes CD8+ qui se transforment en mémoires augmentent leur expression du CD127, chaîne α du récepteur à l'IL-7 (Joshi et al., 2007; Kaech et al., 2003). Récemment, l'équipe de Sarkar et coll., a démontré que l'expression de la molécule KLRG-1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1) pouvait aussi être utilisée afin d'identifier les cellules qui deviendront des mémoires ($KLRG1^-$) dans une population de CTLs (Sarkar et al., 2008). Ainsi, les SLEC (*short-lived effector cell*) sont la population de cellules effectrices éliminées suite à la réponse primaire et sont identifiées par une expression élevée de KLRG1, ainsi que de faibles niveaux d'expression du récepteur à l'IL-7 et du CD27 (Joshi et al., 2007). À l'opposé, les MPEC (*memory precursor effector cells*) représentent le 10% de cellules se différenciant en lymphocytes T mémoires à la suite de la réponse primaire et expriment un faible niveau de KLRG1 et de hauts niveaux d'IL-7 et CD27 (Joshi and Kaech, 2008; Kaech et al., 2003; Sarkar et al., 2008). Il sera question des ces sous-populations de lymphocytes mémoires ainsi que des facteurs moléculaires déterminant leur différentiation plus en détails dans les sections suivantes.



Dynamically Regulated during Memory T Cell Development					
CD45RA	Leukocyte common antigen	Hi	Hi	Lo	Lo
CD45RO	Leukocyte common antigen	Lo	Lo	Hi	Hi
KLRG1	Receptor lectin-like; memory precursor	Lo	Lo/Int	Hi	Lo
CD62L	Lymph node homing receptor	Hi	Lo	Lo	Hi
CCR7	Lymph node homing chemokine receptor	Hi	Lo	Lo	Hi
CD27	TNF receptor superfamily; costimulation	Hi	Lo/Int	Lo/Int	Hi
CD127	IL-7 receptor α chain	Hi	Lo	Lo/Int	Hi
Bcl-2	Anti-apoptotic/cell survival	Int	Lo	Int	Hi

Figure 8 : Changements phénotypiques lors de la différenciation des lymphocytes T CD8+

Plusieurs marqueurs sont plus ou moins exprimés pendant la différenciation des lymphocytes T CD8+ naïfs (N) vers un stade activé ou effecteur (E) puis vers un phénotype mémoire effecteur (Tem) ou mémoire central (Tcm). Hi : expression élevée, Lo : expression faible, Int : expression intermédiaire. ***Modifiée de (Wherry et al., 2007)***

1.3.La réponse T CD8$^+$ mémoire

La caractéristique unique de la réponse adaptative est sa capacité à produire des cellules mémoires spécifiques de l'antigène qui patrouilleront le système de l'hôte à long terme. Ces cellules demeurant en homéostasie dans le système malgré l'absence de leur antigène permettront de reconnaître une infection récurrente et de monter une réponse cytotoxique plus efficace et plus rapide que lors de la réponse primaire.

En effet, une partie des lymphocytes T effecteurs va survivre à la fin de la phase de contraction de la réponse primaire et se différencier en cellules mémoires. Cette population possède un récepteur spécifique de forte affinité pour l'antigène rencontré précédemment ainsi qu'un potentiel d'activation et de prolifération plus rapide. De plus, les lymphocytes T mémoires expriment des marqueurs de surfaces différents de ceux des lymphocytes T naïfs tels que des récepteurs de cytokines, ce qui leur permet de répondre plus rapidement à une réponse immunitaire innée par exemple ou à une nouvelle présentation de l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Cette rapidité et sensibilité accrues des lymphocytes T mémoires dépend donc principalement des marqueurs de surface qu'ils expriment, de l'affinité de leur récepteur, de leur potentiel de prolifération et de sécrétion de cytokines suite à leur activation ainsi que leur survie à long terme dans l'organisme. Toutes ces caractéristiques seront d'ailleurs vues plus en détail dans les prochaines sections.

1.3.1. Génération des lymphocytes T CD8$^+$ mémoires effectrices et centrales

1.3.1.1. Voies de différenciation

À la suite des deux premières phases d'initiation et d'expansion clonale de la réponse primaire, les CTL entrent dans une phase de différenciation qui les mènera soit à l'apoptose soit à un phénotype mémoire. Tel que mentionné précédemment, il est possible d'identifier les différentes sous-populations au cours de leur cheminement vers la mémoire selon l'expression des différentes molécules à leur surface, leur localisation, ainsi que leurs fonctions effectrices (figure 7).

La différenciation des CTL en lymphocytes T CD8+ mémoires dépend aussi de plusieurs facteurs de transcription dont : T-bet/EOMES; BLIMP1/BCL-6; ID2/ID3, et de la signalisation par les membres de la famille STAT, plus particulièrement STAT3/STAT4 et STAT5. Les facteurs de transcription T-bet et EOMES jouent des rôles redondants dans les cellules cytotoxiques en induisant l'expression des molécules cytotoxiques telles que l'IFNγ, le granzyme et la perforine ainsi que des récepteurs de chimiokines (Banerjee et al., 2010; Intlekofer et al., 2005). Il a aussi été démontré que les cellules CD8+ effectrices n'exprimant pas T-bet ne formaient pas de SLEC alors que la surexpression de ce même facteur était suffisante pour différencier cette sous-population de CTL (Joshi et al., 2007). À l'opposé, il a été démontré que l'ablation d'un allèle d'EOMES chez la souris ($Eomes^{+/-}$) diminuait la proportion de lymphocytes mémoires puisqu'une sous-expression d'EOMES diminue l'expression de CD122 et CD62L, deux marqueurs des cellules mémoires (Intlekofer et al., 2005). BLIMP1 et BCL-6 sont quant à eux des facteurs de transcription ayant une activité antagoniste. BLIMP1 est fortement exprimé dans les lymphocytes CD8+ effecteurs, stimulant l'activité cytotoxique de l'IFNγ et du granzyme B. Son expression élevée augmente la formation des SLEC, puis elle diminue à la suite d'une infection virale ce qui favorise la production de cellules effectrices précurseurs de mémoires (MPEC). Ces dernières expriment ainsi peu de BLIMP1 et fortement le BCL-6, facteur de transcription responsable de la formation des lymphocytes T mémoires qui persisteront dans l'organisme (Ichii et al., 2004; Rutishauser et al., 2009).

Les voies de signalisations JAK/STAT sont essentielles et très étudiées en ce qui a trait à la différenciation et l'homéostasie des lymphocytes T CD8+ mémoires. Cette famille contient 7 membres (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6), chacun étant activé par des cytokines distinctes à l'exception de STAT3 et STAT5a/b (Johnston et al., 1995; Leonard and O'Shea, 1998; Yu et al., 1998) (figure 9). Lorsqu'une cytokine se lie à son récepteur, celui-ci phosphoryle une Janus kinase (JAK) qui lui est associée par son domaine N-terminal. Cette dernière se dimérise ce qui active chacun des membres et

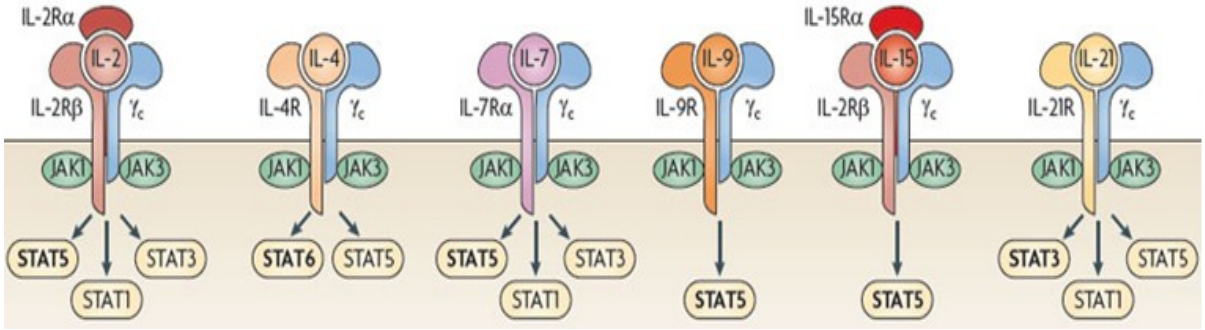


Figure 9 : Les récepteurs de la famille de l'IL-2 et leurs protéines STATs associées
Les récepteurs de la famille γc soit l'interleukine-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-15 et IL-21, sont representés avec les protéines STAT qu'ils activent une fois liés à leur ligand spécifique. Chaque récepteur active une janus kinase (JAK1 ou JAK3) menant à l'activation des STAT (la protéine préférentiellement activée étant représentée en gras). ***Modifiée de (Rochman et al., 2009)***

phosphoryle le récepteur. Un membre spécifique de la famille STAT peut alors se lier aux JAK activés qui phosphoryleront à leur tour ces STATs, ce qui entraine leur dimérisation et leur translocation au noyau (Ihle et al., 1997; Leonard and O'Shea, 1998). Ces protéines sont toutes composées d'environ 700 à 850 acides aminés, elles possèdent toutes un domaine spécifique de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine SH2. Après l'activation de la kinase JAK, la molécule STAT est phosphorylées au niveau d'une tyrosine spécifique à chacune dans la partie carboxy-terminale (Darnell, 1997; Horvath, 2000). Ce domaine SH2 permet l'interaction entre la molécule phosphorylée et sa kinase JAK spécifique ce qui permet la phosphorylation de STAT et sa migration vers le noyau afin de réguler l'expression génique.

Deux familles ont été identifiées comme régulatrices de l'activité des protéines STATs. Certaines cytokines augmentent l'expression de la première famille, les suppresseurs de la signalisation des cytokines (SOCS) en liant leur domaine SH2 directement à une kinase JAK et inhiber sa fonction (Akira, 2000). Par exemple, chez la souris déficiente en CIS1 (*Cytokine Inducible SH2-containing protein 1*), un membre de la famille SOCS, la fonction de STAT5 est diminuée de façon significative dans les cellules T (Matsumoto et al., 1999). La deuxième famille de protéines est induite par l'activation des STATS (*STAT induced STAT*

inhibitors (SSI)) et régule la voie de signalisation JAK/STAT en se liant directement aux protéines STAT activées en en inhibant leur liaison à l'ADN nucléaire, formant une boucle de rétroaction négative (Naka et al., 1998; Naka et al., 1997; Narazaki et al., 1998).

STAT3, STAT4 et STAT5a/b sont les principales protéines de cette famille étant impliquées dans la différenciation et l'homéostasie des lymphocytes T CD8+ mémoires. Le ratio Stat3/Stat4 serait impliqué dans la balance entre les phénotypes MPEC et SLEC, une inhibition de Stat3 causant une déplétion du nombre de CTL ainsi qu'une réponse secondaire antivirale diminuée (Siegel et al., 2011). À l'opposé, une activité accrue de Stat4 induite par l'expression de l'IL-12 augmenterait la génération de cellules effectrices à courte durée de vie (SLEC) (Cui et al., 2011; Joshi et al., 2007).

Les protéines Stat5a et Stat5b sont identiques à 96% et elles ont des activités partiellement redondantes au niveau leucocytaire (Liu et al., 1995). Elles sont activées par une variété de cytokines principalement de la famille γc (IL-2, IL-7 et IL-15) ainsi que certains facteurs de croissance tels que le GM-CSF et l'érythropoïétine (EPO) (Novak et al., 1996). En absence de stimulation, les monomères STAT5 sont inactifs dans le cytoplasme. Lorsqu'une cytokine se lie à son récepteur, les protéines JAK1 et JAK3 sont phosphorylées et recrutent STAT5a et STAT5b qui peuvent former des homodimères (STAT5a/STAT5a ou STAT5b/STAT5b) ou des hétérodimères (STAT5a/STAT5b) puisque leurs promoteurs sur les gènes cibles sont identiques (Grimley et al., 1999). L'association de STAT5a/b en homo- ou hétérodimères serait spécifique à certaines cytokines ou tissus, probablement dû à la grande similarité de leur domaine de liaison tyrosine/SH2 (Lin et al., 2012; Meinke et al., 1996). Il existe plusieurs gènes régulés par les dimères STAT5a/b dont principalement la famille de Bcl-2 et la chaine α du récepteur d'IL-2 au niveau des lymphocytes (Decker and Meinke, 1997; Meyer et al., 1997b). Ainsi, l'activation de STAT5 par l'IL-15 augmente l'expression de la sous-unité α du récepteur γc ainsi que les molécules

antiapoptotique Bcl-2 et Bcl-X_L, impliquant cette protéine dans le processus de prolifération et de survie cellulaire (Berard et al., 2003). Cette protéine représente un élément important entrant dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes mémoires. En effet, Hand et al. (2010) ont démontré que l'expression constitutive de la voie JAK/STAT5 augmentait significativement la survie des lymphocytes T CD8+ effecteurs et mémoires entre autre en diminuant la phase de contraction des cellules effectrices KLRG1^{hi} IL-7Rα^{lo} et en promouvant la prolifération homéostatique des lymphocytes mémoires (Hand et al., 2010). Ainsi, les CTL peuvent être différenciés en MPEC et SLEC selon l'expression de certaines molécules de surfaces citées plus tôt. Par la suite, la population de MPEC va persistée et, selon l'expression de certains récepteurs et leur réponse à l'IL-7 et l'IL-15, pourra être divisée en trois catégories soit les cellules mémoires effectrices (Tem), les cellules mémoires centrales (Tcm) et les cellules mémoires résidant dans les tissus (Trm).

Les critères de discrimination de ces sous-populations de lymphocytes mémoires ont été établis en fonction de leur potentiel cytotoxique et prolifératif, leur localisation tissulaire ainsi que leur expression de différents marqueurs de surfaces (Sallusto et al., 1999). Les lymphocytes Tcm sont localisés au niveau des ganglions lymphatiques, de la rate, du sang et de la moelle osseuse alors que les Tem sont majoritairement localisés au niveau des tissus et des organes tels que le foie, les poumons et le cœur. Les Trm représentent une sous-population lymphocytaire qui ne circulent pas dans l'organisme mais demeure plutôt dans les tissus périphériques tels que les organes non-lymphoïdes ou la peau. Ces cellules sont les premières à produire une réponse immunitaire lors d'une réinfection de ces tissus. Cette différence de localisation s'explique par l'expression de différentes molécules d'adhésion et de récepteurs de chimiokine chez la souris comme chez l'homme. Par exemple, à l'instar des Tem, les Tcm expriment de hauts niveaux de CD62L et de CCR7, deux molécules responsables de la localisation aux organes lymphoïdes. Ainsi, les Tem CD62L^{lo}CCR7^{lo} peuvent plus facilement entrer dans les tissus non lymphoïdes par diapédèse, leur entrée étant aussi facilitée par une

expression plus élevée d'intégrines telles que LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1; CD11a) qui se lient aux molécules d'adhésion ICAM-1 ou CD54 (Masopust et al., 2001; Sallusto et al., 1999; Woolf et al., 2007). Par la suite, une partie de ces cellules effectrices mémoires vont demeurer dans les tissus grâce à une expression très faible de CD62L et élevée du CD69 et de l'intégrine CD103, ils survivront par la suite dans ces tissus (Trm) (Gebhardt and Mackay, 2012).

1.3.1.2. Fonctions des sous-populations CD8$^+$ mémoires

Les Tem CD62L^{Lo}CCR7^{Lo} sont principalement reconnus pour leur capacité rapide à acquérir des fonctions cytotoxiques ainsi qu'à produire de l'IFNγ et du TNFα dès leur stimulation (Sallusto et al., 1999). Puisqu'ils sont localisés au niveau des tissus non lymphoïdes, les Tem et Trm représenteraient la première ligne de défense en cas d'une nouvelle rencontre avec leur antigène spécifique. Les Tcm CD62L^{HI}CCR7^{HI} sont présents au niveau des tissus lymphoïdes secondaires et fournissent une meilleure protection lors d'une réinfection puisqu'elles ont une capacité importante de sécrétion d'IL-2 et prolifèrent donc plus rapidement que leurs homologues Tem (Wherry et al., 2003).

Lors d'une réponse secondaire, les Tem circulants dans l'organisme sont rapidement recrutés dans les tissus cibles grâce à leur expression de récepteurs de chimiokines spécifiques. Elles permettent alors de contrôler l'infection et exercent leur activité cytotoxique par la sécrétion de granules cytotoxiques et d'IFNγ. Quelques jours plus tard, elles seront rejointes par un très grand nombre de cellules effectrices secondaires dérivant de la prolifération accrue des Tcm dans les organes lymphoïdes secondaires.

1.3.2. L'homéostasie des lymphocytes T CD8$^+$ mémoires

La caractéristique primordiale d'un lymphocyte T CD8+ mémoire est de survivre et de s'autorenouveller afin de patrouiller l'organisme à l'affut d'un retour possible du pathogène. Cette survie et prolifération basale en absence d'antigène, du

CMHI ou de molécules de costimulation dépend des cytokines IL-15 et IL-7 et de certaines molécules de la famille du TNF.

1.3.2.1. Cytokines nécessaires à l'homéostasie

Il est aujourd'hui reconnu que la survie des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires ne requiert ni la présence de l'antigène ni une présentation antigénique via le CMHI mais plutôt la disponibilité de deux cytokines soit l'IL-7 et l'IL-15, dont chacune joue un rôle spécifique dans l'homéostasie des lymphocytes mémoires. L'IL-7 permet la survie des lymphocytes mémoires CD8+ alors que l'IL-15 est requise pour leur prolifération homéostatique et donc leur auto-renouvellement au cours du temps. Les récepteurs de ces cytokines partagent tous la chaîne γc en plus d'une chaine α spécifique et de haute affinité pour chaque cytokine (IL7Rα et IL15Rα). L'IL-15 partage aussi une troisième chaîne commune avec le récepteur de l'IL-2 nommée IL-2Rβ (CD122). En plus de partager certaines de leurs sous-unités, ces récepteurs utilisent les mêmes mécanismes de transduction du signal. La liaison d'une cytokine au niveau de la sous-unité γc induit l'activation de JAK3 menant à la phosphorylation de STAT5 alors que la liaison de l'IL7Rα ou de l'IL15Rβ induit l'activité de JAK1 puis de STAT3 (Johnston et al., 1995).

Tel que mentionné précédemment, les lymphocytes T CD8 mémoires expriment de haut niveau d'IL-7Rα (CD127) par rapport aux CTL ce qui leur confèrerait un avantage puisque l'IL-7 n'est disponible qu'à de faibles niveaux dans l'organisme (Kaech et al., 2003). Ceci a été confirmé à l'aide d'un modèle d'inhibition de l'IL-7Rα menant à la mort des cellules T CD8+ mémoires (Carrio et al., 2007; Mazzucchelli and Durum, 2007; Schluns et al., 2000). L'IL-7 est principalement disponible dans les organes lymphoïdes et la moelle osseuse, deux sites de migration des lymphocytes T mémoires (Tm) (Goldrath, 2002; Hara et al., 2012). Facteur critique pour l'homéostasie des cellules T CD8+ mémoires, elle augmente leur survie en permettant l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Schluns et al., 2000; Wojciechowski et al., 2007). L'IL-7 inhibe aussi l'expression de Bim, une protéine pro-apoptotique qui stimule

l'apoptose des lymphocytes T CD8+ mémoires (Wojciechowski et al., 2006). Les Tm sont toutefois plus sensibles à la signalisation de l'IL-15 qu'à celle induite par la présence d'IL-7, démontré par l'inhibition du récepteur de l'IL-7 ne provoquant pas de défaut de prolifération aussi grand chez ces cellules que l'inhibition du récepteur IL15Ra (Goldrath, 2002; Tan et al., 2002).

Les facteurs T-bet et EOMES coopèrent aussi à la survie des mémoires en augmentant l'expression du CD122 (IL2Rβ) à la surface cellulaire, et par le fait même la réponse à l'IL-15 (Banerjee et al., 2010; Intlekofer et al., 2005). Cette cytokine formée d'un groupe de 4 hélices α, se lie avec une affinité intermédiaire ($1x10^9$ /M) au récepteur IL2Rβ (Lodolce et al., 2002). Elle peut transmettre un signal par sa liaison au récepteurs IL2Rβ/γc en absence du récepteur IL15Rα avec lequel elle a cependant une affinité supérieure ($1x10^{11}$/M). L'interaction récepteur-ligand mène principalement à l'activation des MAP kinases ainsi qu'à la phosphorylation des kinases lck et syk, molécules nécessaires à la transduction intracellulaire du signal (Waldmann and Tagaya, 1999). Cette signalisation par la liaison de l'IL-15 à son récepteur permettra l'autorenouvellement des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires ainsi que leur survie en les protégeant contre la mort cellulaire (Lodolce et al., 2002)

L'importance de l'IL-15 dans l'homéostasie des cellules T mémoires a été révélée chez des souris IL-$15^{-/-}$ et IL-15$R\alpha^{-/-}$ dans lesquelles on observe une diminution importante des cellules CD8+ mémoires (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998; Willerford et al., 1995). Inversement, cette population augmente d'environ 5 fois dans les souris transgéniques pour l'IL-15 ou lors d'injection *in vivo* de la cytokine (Kennedy et al., 2000; Yajima et al., 2002). Cette cytokine permet aussi de protéger les lymphocytes contre l'apoptose médiée par Fas-FasL *in vitro* et *in vivo*. Des souris traitée avec un anticorps contre Fas démontrent une apoptose massive de leurs lymphocytes mémoires alors qu'une administration simultanée d'une protéine de fusion IL-15 IgG2b prévenait cette réaction (Bulfone-Paus et al., 1997). Il est toutefois incertain si l'IL-15 permet de protéger la mort

cellulaire par apoptose des lymphocytes T CD8+ par l'augmentation des protéines anti-apoptotiques telle que bcl-2 ou par l'induction du cycle cellulaire. L'IL-15 n'est donc pas essentiel à la production des CD8+ mémoires mais plutôt à leur survie à long terme.

Il a aussi été démontré à l'aide souris transgéniques pour Stat5 que l'expression de Stat5 jouait un rôle dans l'homéostasie des lymphocytes mémoires. Les lymphocytes T $CD8^+$ provenant de souris surexprimant la protéine Stat5b prolifèrent plus rapidement et expriment le Bcl-2 plus fortement après une stimulation par le RCT. Ainsi, un plus grand nombre de lymphocytes mémoires peut aussi être observés à la fin de la stimulation avec OVA *in vivo* chez ces souris (Kelly et al., 2003). À l'opposé, les souris $Stat5^{-/-}$ expriment moins la sous-unité α du récepteur des cytokines γc et comptent moins de cellules CD8+ périphériques ainsi qu'une diminution importante des mémoires résultantes (Nakajima et al., 1997). Ainsi, l'activation de Stat5a/b permettrait d'augmenter la fonction immunitaire mémoire suite à une infection mais aussi assurerait une prolifération homéostatique des lymphocytes T CD8+ mémoires en réponse à l'IL-15.

1.3.2.2. Rôles des récepteurs de la famille du TNF

Les membres de la famille du TNF sont des protéines transmembranaires de type I possédant tous un domaine riche en cystéine (*Cystein-Rich Domain* (CRD)) hautement conservé chez les membres connus actuellement chez les mammifères (Potter et al., 2004) (figure 10). Les TNFR peuvent être divisés en trois groupes : ceux contenant un domaine cytoplasmique de mort cellulaire, ceux n'ayant pas ce domaine et qui servent d'antagonistes (« decoy ») et ceux contenant un motif TRAF (TNFR Associated Factor). Ils augmentent leur expression membranaire et forment des complexes trimériques lorsqu'ils rencontrent leurs ligands. L'expression de ces récepteurs sur les lymphocytes T CD8+ mémoires peut être constitutive, induite par une signalisation par le RCT ou certaines cytokines dont l'IL-15 (Duttagupta et al., 2009). De plus, certains ligands tels qu'OX40L, 4-1BBL

et GITRL peuvent aussi être exprimés conjointement sur les cellules T, régulant ainsi les signaux de costimulation et de survie entre les lymphocytes (Croft, 2003b; Snell et al., 2012). Les ligands sont définis comme des protéines transmembranaires de type II contenant tous un domaine homologue au TNF (*TNF Homology Domain* (THD)) dans leur domaine C-terminal. Ces ligands peuvent agir de façon directe sous leur forme membranaire en se liant au TNFR, ou de façon indirecte après avoir été clivés et sécrétés dans la circulation (Potter et al., 2004).

La signalisation en aval des TNFR est permise grâce au recrutement de protéines adaptatrices (*TNFR associated factors* (TRAF)) ou des domaines de mort cellulaire (TNFR-associatied Death Domain (TRADD)). Il y a aujourd'hui 7 TRAF connus (TRAF1-7) menant tous à différents effets biologiques en fonction de leur liaison à un TNFR spécifique (revue dans (Cabal-Hierro and Lazo, 2012) et (Wang et al., 2010)). Ultimement, la signalisation mène à l'activation de facteurs de transcription dont NF-κB, un joueur essentiel dans la survie cellulaire, l'inflammation et la survie cellulaire (figure 10). En absence de stimulation, NF-κB est retenu dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice IkB (Inhibitor of NF-κB). Suite à une activation, la protéine IkB est phosphorylée et dégradée par le protéasome permettant la translocation de NF-κB dans le noyau afin d'activer la transcription (Napetschnig and Wu, 2013).

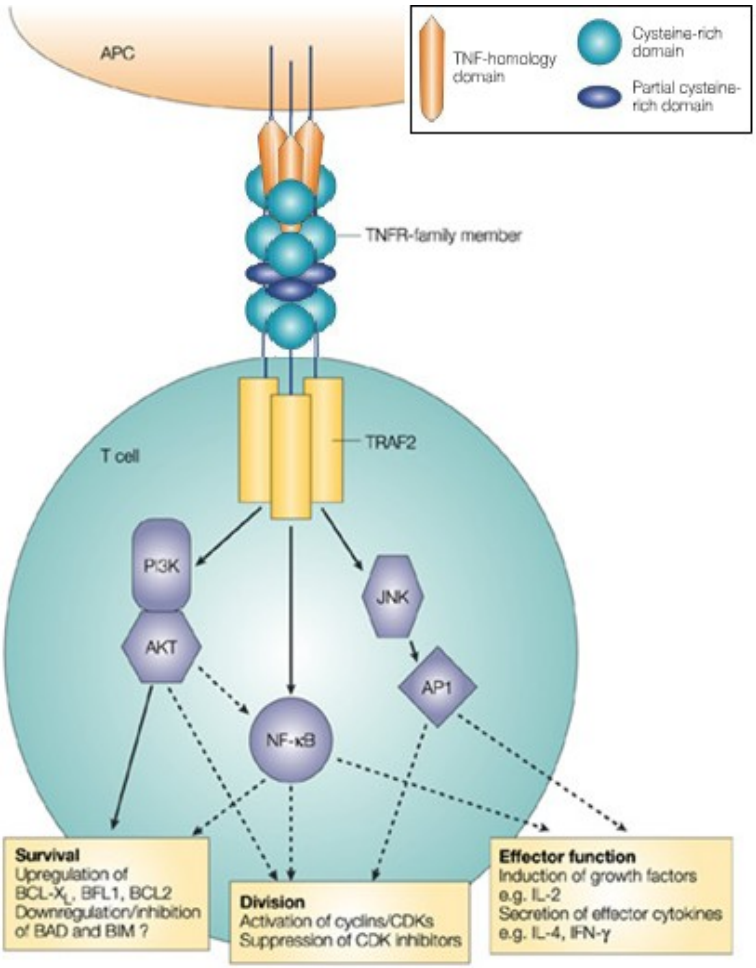


Figure 10 : Composition et signalisation des récepteurs de la famille du TNF

Le ligand du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF) est une protéine transmembraine de type II alors que le récepteur est un monomère transmembranaire de type 1. Une fois activé, le récepteur monomérique s'associe afin de former un trimère et s'associer à un TRAF spécifique. Les différents TRAFs mènent à la signalisation via AKT, NF-kB ou JNK à la survie, la division cellulaire ou aux fonctions effectrices des cellules CD8+. ***Modifiée de (Croft, 2003a)***

Dans la famille des TNFR, le couple 4-1BB/4-1BBL joue un rôle important dans le développement et le maintien de la mémoire immunitaire à long terme (Croft, 2003b; Watts, 2005). Des lymphocytes T CD8+ transférés par transfert adoptifs dans des souris 4-1BB$^{-/-}$ ont une phase d'expansion et de contraction normale mais le nombre de lymphocytes CD8+ mémoires retrouvés après l'immunisation est significativement diminué (Bertram et al., 2002). Une déficience dans la réponse cytotoxique des cellules mémoires a aussi été confirmée chez la souris 4-1BBL$^{-/-}$ en 2007 alors que l'équipe de Fuse et coll. a observé une augmentation majeure du titre viral ainsi qu'une diminution significative de la sécrétion de granzyme B (Fuse et al., 2007). Le récepteur 4-1BB et son ligand ont été particulièrement étudiés pour leurs rôles dans la survie et la réactivation des cellules T CD8+ mémoires. Ici encore, l'IL-15 vient jouer un rôle important

puisqu'elle permet l'expression de 4-1BB à la surface des lymphocytes mémoires, favorisant leur survie (Pulle et al., 2006). Une étude menée par Pulle et coll. (2006) a démontré que les souris 4-1BBL$^{-/-}$ avaient de 2 à 3 fois moins de lymphocytes T CD8+ mémoires suite à une infection, indiquant ainsi que l'interaction 4-1BB avec son ligand serait nécessaire à la production et/ou la survie des cellules mémoires en absence de leur antigène. La voie de signalisation connue actuellement dans la survie des lymphocytes T CD8+ mémoires a été largement étudiée par notre laboratoire et implique les molécules TRAF1 et LSP1 en aval de 4-1BB. Lors de la liaison avec son ligand, 4-1BB recrute TRAF1 ce qui permettra le recrutement de LSP1 (Sabbagh et al., 2013). Cette voie de signalisation mène ultimement à l'activation d'ERK et à la diminution de l'expression de la molécule proapoptotique Bim, démontrant le rôle essentiel de 4-1BB dans la survie des lymphocytes T CD8+ mémoires (Sabbagh et al., 2008; Sabbagh et al., 2006).

Un autre récepteur important de la famille du TNF est le récepteur du TNF induit par les glucocorticoïdes (*glucocorticoid-induced TNFR,* GITR). Principalement exprimé à la surface des lymphocytes T régulateurs (Treg), il est aussi présent à la surface des lymphocytes CD8^{+} alors que son ligand (GITRL) est produit par les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés (Nocentini et al., 1997; Nocentini and Riccardi, 2009). Ce membre de la famille des TNFR augmente la survie des lymphocytes T CD8^{+} principalement en induisant une résistance à la suppression par les Treg ainsi qu'une expression plus élevée de la molécule anti-apoptotique Bcl-X_L (Nishikawa et al., 2008; Snell et al., 2010). Les recherches effectuées par Watts et coll., on permis d'observer que NF-κB était activé par l'expression de GITR et par la signalisation de TRAF2 et TRAF5, expliquant l'augmentation de Bcl-X_L. Des lymphocytes GITR$^{-/-}$ stimulés par le RCT puis injectés *in vivo* subissent plus d'apoptose que les cellules normales (WT), démontrant un rôle important du récepteur dans la survie cellulaire (Snell et al., 2012). D'après cette même étude, des lymphocytes mémoires présents dans la moelle osseuse ou cultivés *in vitro* en présence d'IL-15 présentent une augmentation de GITR à leur surface. Ainsi, la

survie des lymphocytes mémoires lorsque stimulés pourrait être dépendante de la présence de ce membre de la famille des TNFR grâce à l'induction de ses voies de signalisations intracellulaires dont NF-κB.

1.4. Rôle des lymphocytes CD8$^+$ mémoires dans la latence virale

1.4.1. Virus latents de la famille des Herpesviridae

L'infection de l'hôte par un virus crée une infection primaire aigue qui pourra être contrôlée par le système adaptatif afin d'éliminer en totalité le virus et générer une réponse mémoire contre celui-ci. Ainsi, les infections aigües sont aujourd'hui plus facilement traitées et peuvent être prévenues grâce à la vaccination. Cependant, une élimination incomplète des particules virales peut causer une infection chronique où le virus peut fuir la réponse immunitaire et continuer à se répliquer (figure 11). Il existe aussi une possibilité où le virus devient quiescent et forme un réservoir biologique chez l'hôte à la suite de la réponse adaptative primaire. Ce type d'infection dit « latente »

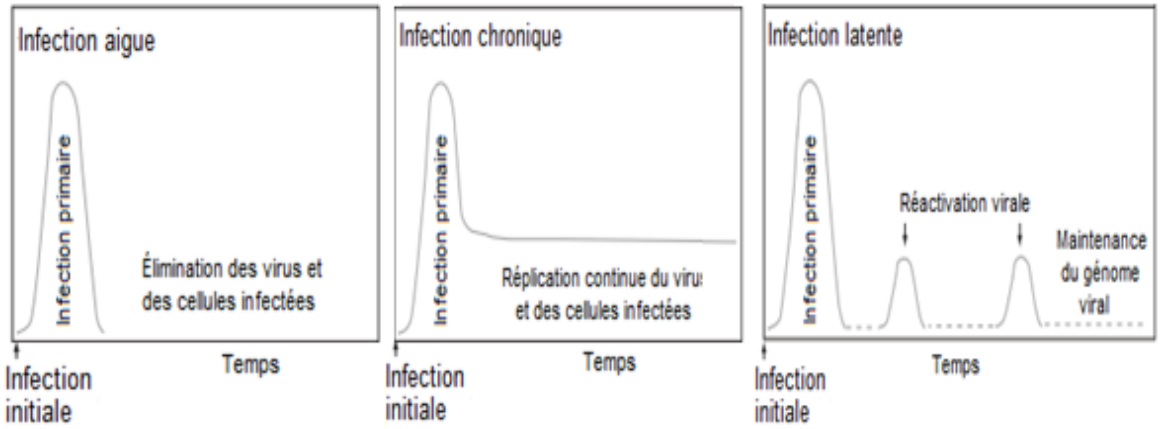


Figure 11: Infection latente et persistante

En temps normal, les particules virales sont complètement éliminées après l'infection primaire, il s'agit d'une infection dite aigue (gauche). Dans certaines cas, certaines cellules infectées persistent et le système immunitaire n'arrive pas à enrayer la réplication virale, il s'agit d'une infection dite chronique (centre). Le système immunitaire pour aussi se faire leurrer par le virus qui maintient son génome viral inactif dans certaines cellules. Le virus devient latent et peut se réactiver à différentes périodes d'immunodéficience par exemple. ***Modifiée de (Mocarski and Grakoui, 2008)***

implique que le génome viral persiste chez l'hôte sans qu'aucune réplication active ne soit détectée (Mocarski and Grakoui, 2008). Il est important de faire la différence entre une infection latente d'une infection chronique où les lymphocytes T CD8 rencontrent constamment leur antigène spécifique et sont continuellement activés. Ce type d'infection persistante mène habituellement à l'épuisement des cellules antigène-spécifiques et ultimement à la mort cellulaire. Une infection avec un virus restant latent dans l'organisme ne perturbe pas les fonctions de l'immunité adaptative et une surveillance accrue par les lymphocytes T mémoires peut même être observée aux sites de latence virale (Bevan, 2011).

Les Herpesvirus sont les mieux connus pour leur capacité à demeurer latent de façon asymptomatique dans l'organisme (tableau 1). Ils sont divisés en trois groupes soit les alpha-, beta- et gammaherpesvirus le plus souvent représenté par un virus type soit le virus de la varicelle-zona (VZV), le cytomégalovirus (CMV) et le virus Epstein Barr (EBV) respectivement (Aurelian et al., 2008). Ce sont de larges virus à ADN double-brin encapsulés dans une capside, d'un tégument et d'une enveloppe composée des lipides de la membrane cellulaire d'où ils bourgeonnent (Padgett et al., 2007). Les virus de l'herpès sont cellules-spécifiques, c'est-à-dire qu'ils infectent un certain types cellulaires qui n'est pas permissif à la réplication mais pouvant devenir un réservoir pour le génome viral. Le système immunitaire ne peut alors plus détecter la présence du virus. Le virus peut induire des modifications au niveau des cellules infectées malgré son état de latence, par exemple l'EBV utilise la machinerie de réplication des lymphocytes B afin de multiplier son génome puis sera relâché lorsque le lymphocyte B sera activévia le BCR. La réactivation de virus tel que l'herpes (HSV1, HSV2) peut mener à des infections aigues récurrentes et même à la cécité alors que la réactivation du cytomégalovirus peut induire le rejet d'organes chez un hôte immunosupprimé (Preston and Efstathiou, 2007; Sinclair and Sissons, 2006).

Tableau 1 : Virus causant des infections latentes

Virus	Maintenance du génome	Tropisme cellulaire/tissulaire	Maladie chronique induite
HHV-6A, -6B et -7	Épisome latent	Lymphocytes T CD4+	Maladies opportunistes (ex. : infection herpétique, tuberculose, candidose)
VZV	Épisome latent	Ganglions sensoriels	Varicelle
EBV	Épisome latent	Lymphocytes B	Maladie lymphoproliférative, Lymphome de Burkitt et Hodgkin
CMV	Épisome latent	Cellules progénitrices myéloïdes	Maladies congénitales et opportunistes

1.4.2. Latence et réactivation virale

La figure 12 illustre le processus de réactivation virale pour chacun des groupes d'herpesvirus quoique les stimuli menant à l'induction de la réplication virale de virus préalablement latent restent majoritairement inconnus ou controversés (Penkert and Kalejta, 2011). La réactivation des virus de la famille alpha et betaherpesvirus peut être causée par divers stimuli externes tel qu'un stress ou une immunosuppression menant à l'expression de gènes viraux (Hill et al., 2001; Jones, 2003).

Le virus de l'herpes (1 et 2) ainsi que de la varicelle-zona infecte principalement les neurones et les cellules gliales après avoir infectés les cellules épithéliales des muqueuses (Mocarski and Grakoui, 2008; Padgett et al., 2007). Une fois le cycle viral réactivé, les virions produits sont secrétés dans les tissus par transport antérograde le long des axones. Le CMV établit son réservoir viral au niveau des cellules myéloïdes CD34+ de la moelle osseuse (Penkert and Kalejta, 2011). Lorsqu'elles se retrouvent dans la circulation périphérique, la différenciation des ces cellules en macrophages ou cellules dendritiques induit la réactivation du virus (Sinclair and Sissons, 2006). Le virus Epstein Barr quant à lui reste latent dans les cellules B mémoires au repos et possède des gènes de latences lui permettant de contrôler sa réplication et ainsi évader la surveillance adaptative (Young et al., 2008). Lorsqu'un lymphocyte B infecté reconnaît un antigène via son récepteur (BCR), il se

transforme en cellules plasmatiques et induit la réactivation du génome de l'EBV (Kuppers, 2003).

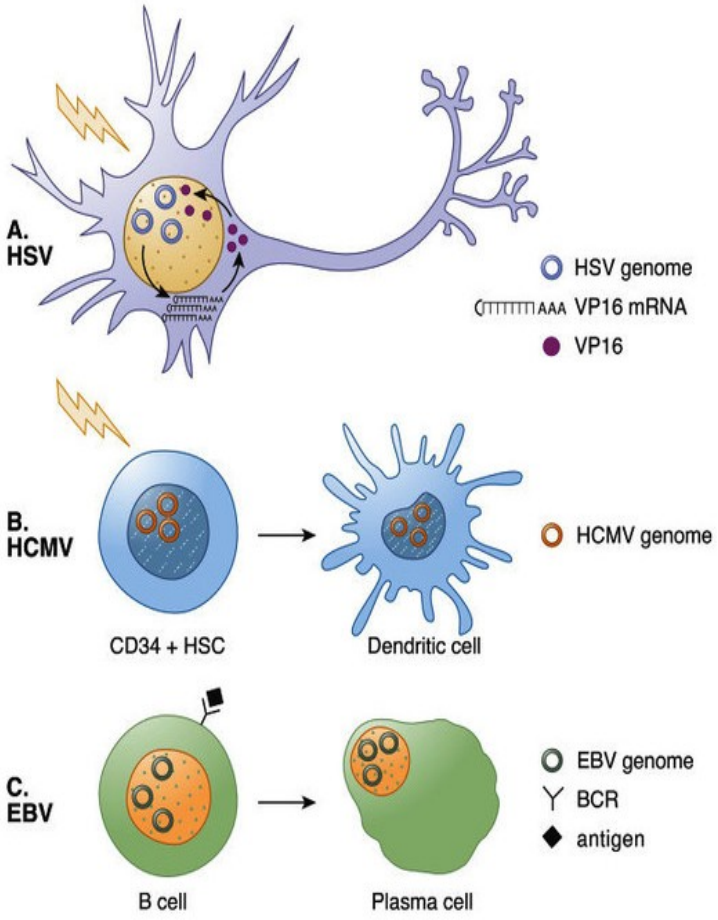


Figure 12 : Réactivation des herpesvirus latents

A. *Des événements stressants peuvent induire la production de nouveaux virions (VP16) du HSV-1 ce qui provoquera l'activation de la machinerie réplicative de la cellule infectée.*

B. *Le même type d'événements peuvent induire la différenciation des cellules CD34+ en cellules dendritiques ce qui pourrait enclencher le processus de réplication virale du HCMV.*

C. *Les cellules B activées via leur BCR se différencient en cellules plasmatiques ce qui active le génome latent de l'EBV chez les cellules infectées.*

Open access (Penkert and Kalejta, 2011)

1.4.3. Contrôle de la réplication virale par le système immunitaire adaptatif

Le contrôle de la réplication virale représente la balance entre l'efficacité des virus à échapper ou moduler le système immunitaire et la capacité de ce dernier à maintenir un état de vigilance optimal. Plusieurs études tendent à démontrer que le système immunitaire ne serait pas totalement « berné » par les virus latents et que les lymphocytes T CD8+ mémoires auraient un rôle important dans le contrôle et le maintient de la latence (Gebhardt et al., 2009; Khanna et al., 2004; Torti and Oxenius, 2012). Par exemple, lors d'une infection au HSV-1, les cellules infectées vont produire

de plus haut niveau de la chimiokine RANTES et des cytokines IFNγ et TNFα, permettant une localisation des lymphocytes T CD8+ spécifiques au site de latence (Minami et al., 2002). De plus, des analyses histologiques ont permis de découvrir une accumulation de lymphocytes CD4 et CD8 au niveau du réservoir viral et ce, pour toute la vie de l'hôte (Shimeld et al., 1995; Theil et al., 2003). Les lymphocytes T CD8+ mémoires périphériques présents bloqueraient la réactivation virale du virus de l'herpès (HSV-1) en bloquant les gènes nécessaires au cycle viral ainsi qu'en produisant de grande quantité d'IFNγ et de granules lytiques non cytotoxiques (Cantin et al., 1999; Liu et al., 2000). Cette capacité des lymphocytes T CD8+ mémoires à réprimer la réactivation virale de manière non-cytotoxique permettrait une protection des organes et tissus infectés.

Dans le cas du cytomégalovirus (CMV), une grande proportion de la population CD8 mémoire (≈10%) devient spécifique pour ce virus après l'établissement de la latence (Sylwester et al., 2005). Composé principalement de cellules mémoires effectrices, cette population s'accumule au niveau des organes lymphoïdes périphériques tel que la rate, le foie et les poumons. Torti et Oxenius (2012) ont récemment démontré que cette population de cellules effectrices provenait essentiellement d'une réplication active des lymphocytes T CD8+ mémoires centraux situés au niveau des ganglions lymphatiques (Snyder et al., 2011). Cette activité serait due à la reconnaissance des cellules infectées par les Tcm spécifiques aux épitopes du CMV au niveau des ganglions, induisant leur différenciation en phénotype effecteur ainsi que leur réplication et mobilisation vers les sites périphériques. De plus, la survie des ces cellules mémoires au site de latence en absence de leur antigène suppose la présence d'autres facteurs de survie tel que des récepteurs de la famille du TNF comme 4-1BB ou la sécrétion de cytokines pro-survie telles que IL-15 et l'IL-7. Finalement, les gammaherpesvirus tel que l'EBV ont développé des méthodes très efficaces afin d'évader la surveillance du système immunitaire adaptatif. Ainsi, les gènes de latences exprimés par le virus l'empêchent d'être présenté aux lymphocytes T par les cellules B infectées en induisant une diminution de l'expression des molécules du CMH (Penkert and Kalejta, 2011).

Il est aussi intéressant de noter que plusieurs études semblent démontrer un rôle de la voie de signalisation NF-κB dans le contrôle et la réactivation des virus Herpes. Entre autres, JNK et ERK1/2 ont été identifiés comme nécessaires à la réplication virale du VZV (Rahaus et al., 2006) alors que NF-κB et *c-Jun* auraient quant à eux un rôle dans l'activation de promoteurs des gènes de la réactivation du CMV (Benedict et al., 2004). L'activité de p38, ERK et JNK serait quant à eux responsable de la réactivation *in vitro* de l'EBV Matusali (Matusali et al., 2009). D'ailleurs, Traylen et coll. (2011) ont constaté que la plupart des facteurs de transcriptions nécessaires à la réactivation du cycle lytique des virus de la famille de l'herpes pouvaient être activés par des réponses cellulaires au stress (Traylen et al., 2011). Ainsi, des cytokines et des facteurs de croissances sécrétés en situation de stress pourraient être responsables de la réactivation de certains virus latents.

2. Le stress

2.1. Définition biologique

En 1975, Hans Selye fut le premier à donner une définition du stress comme étant « toute réponse non spécifique du corps à une demande lui étant imposée » (Selye, 1975). Ce n'est que 20 ans plus tard qu'une notion de « seuil » a été ajoutée à cette définition, impliquant que passé un certain stade, toute demande supplémentaire imposée à un individu provoquera une réponse de stress (Chrousos and Gold, 1992). Le stress peut se présenter de façon psychologique ou physique et peut être aigu, soit de courte durée (de quelques secondes à 1 heure) ou chronique, c'est-à-dire plus d'une heure et de façon constante.

La forme et l'intensité du stress varie selon la capacité de chaque individu à interpréter et gérer ces situations. Cependant, chez l'homme plusieurs modèles ont été étudiés afin de reproduire ou analyser les effets du stress tels que les discours oraux, les examens psychologiques ou physiques ainsi que les aidants naturels ou les dépressifs (Coskun et al., 2010; Glaser, 1999; Glaser et al., 1993; Sarid et al., 2001). Chez la souris, les études par centrifugation, chocs électrique aux pattes, rétention et perturbations

sociales sont encore aujourd'hui utilisées (revue dans (Bowers et al., 2008)). Une situation considérée comme stressante pour un individu implique une réponse biologique hypothalamique. Des hormones sont alors relâchées dans la circulation ce qui mène à l'activation de la voie hypotalamique-pituitaire-adrénale (HPA) ou du système nerveux sympathique (SNS).

2.2. Réponse neuroendocrine au stress

Les deux types de stress – aigu et chronique – activent chacun leur voie respective soit la voie HPA ou le SNS. Ces deux axes de modulation neuroendocrine face au stress mènent à la sécrétion d'hormones spécifiques ainsi qu'à des conséquences immunitaires différentes et souvent contraires.

Le stress aigue – de courte durée – prépare l'organisme à une réponse de fuite ou de lutte face à un danger pour la survie. La réponse biologique s'effectue en quelques secondes et active le système nerveux sympathique via la sécrétion d'acétylcholine par les fibres préganglionnaires de la médulla surrénale. Ultimement, de l'adrénaline sera sécrétée dans le système sanguin et de la noradrénaline directement aux organes et tissus par les fibres sympathiques terminales (revue dans (de Kloet et al., 2005)). Ces hormones du stress aigu appartiennent au groupe des catécholamines. Une situation de stress peut aussi être reconnue par l'hypothalamus qui sécrète alors l'hormone de sécrétion de la corticotrophine (CRH) ce qui permet la stimulation de l'hypophyse. Une fois activée, cette glande sécrète l'adrénocorticotrophine (ACTH) dans la circulation sanguine jusqu'aux glandes surrénales qui synthétisent et sécrètent les glucocorticoïdes (figure 13). L'activation dans plusieurs situations différentes de la voie HPA mène systématiquement à une augmentation des niveaux de glucocorticoïde sanguin (McCarty et al., 1991; Shanks et al., 1991).

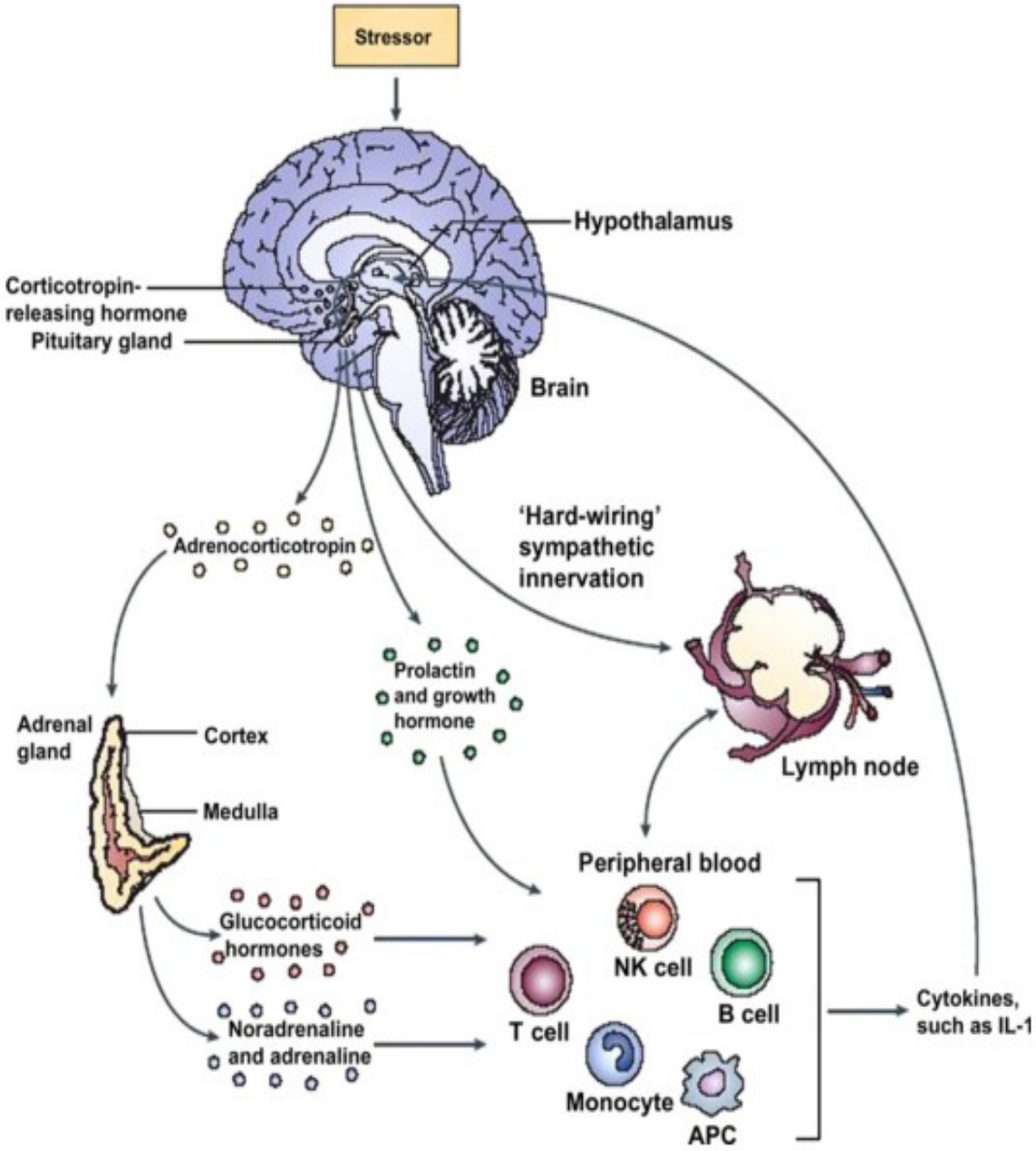


Figure 13: Réponse du système nerveux central face à un stress

Lorsqu'une situation de stress est perçue par le système nerveux central (SCN), l'axe hypotalamique-pituitaire-adrénal (HPA) libère des hormones de stress. Ces hormones – glucocorticoïdes ou catécholamines – pourront agir directement sur les ganglions lymphatiques ou indirectement via la circulation sur les différentes cellules du système immunitaire. ***Modifiée de (Webster Marketon and Glaser, 2008)***

2.3. Hormones de stress

2.3.1. Définitions et fonctions

2.3.1.1. Catécholamines

L'adrénaline et la noradrénaline sont des catécholamines produites par les glandes médullosurrénales et les neurones postganglionnaires qui agissent au niveau du système nerveux central et périphérique respectivement. Elles se lient aux récepteurs α- et β-adrénergique au niveau de la surface cellulaire. Fortement impliquées dans la réponse de survie de l'organisme, les catécholamines sont reconnues pour provoquer une augmentation quasi instantanée de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle et du métabolisme glucidique (Oberbeck, 2006).

Une infection virale représente aussi un danger pour la survie d'un organisme et les catécholamines jouent un rôle d'activation du système immunitaire en augmentant la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la production de cytokines et d'anticorps (Flint et al., 2011; Kruszewska et al., 1995). Les fibres nerveuses terminales du SNS innervent les organes immunitaires et le récepteur β_2-adrénergique est présent de façon ubiquitaire sur les cellules du système immunitaire (Madden, 2003). Ainsi, de nombreuses maladies auto-immunes dont l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques, présentent une perte d'expression ou de signalisation des récepteurs β-adrénergiques à la surface des lymphocytes (Baerwald et al., 1992; Zoukos et al., 1992). Cependant, il a aussi été démontré que l'exposition à certains agents stressants ou activateurs du système nerveux sympathique diminuait spécifiquement la réponse T anti-virale ainsi que l'activité des cellules NK (Cunnick et al., 1990; Irwin et al., 1988).

2.3.1.2. Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes font partie de la famille des hormones stéroïdiennes comprenant aussi les minéralocorticoïdes (aldostérone) et les hormones sexuelles (androgène, œstrogène et progestérone). Les glucocorticoïdes sont sécrétés par l'organisme en faible dose selon un rythme circadien et ils affectent le métabolisme des glucides et des protéines (Cutolo et al., 2011). Cependant, ces hormones sont surtout reconnues pour leurs effets anti-inflammatoires fortement utilisés en clinique depuis leur première utilisation en 1949 dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Hench et al., 1949). Le cortisol et la cortisone sont les glucocorticoïdes produits par l'Homme alors que la corticostérone est l'équivalent murin.

Chez l'Homme, le cortisol sanguin est majoritairement lié à une globuline (environ 90%) – alors nommé cortisone – alors que le 10% restant représente la forme active. Le cortisol (ou corticostérone) a de nombreux impacts sur le métabolisme principalement au niveau de l'augmentation de la glycémie, la dégradation protéique ainsi que la régulation des rythmes circadiens (James et al., 2007). Il a aussi une forte action anti-inflammatoire et immunosuppressive principalement en favorisant l'apoptose des leucocytes et en diminuant la sécrétion des cytokines et chimiokines (Almawi et al., 1996; Barnes, 1998).

Le récepteur des glucocorticoïdes (GCR) est exprimé de façon ubiquitaire par les cellules de l'organisme (Nicolaides et al., 2010). Il est un membre de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et se lie avec une forte affinité aux glucocorticoïdes. Une fois entré dans le noyau, le complexe GC-GCR permet une signalisation contexte et cellule-spécifique.

2.4. Signalisation moléculaire des glucocorticoïdes

Les concentrations physiologiques de glucocorticoïdes endogènes se situent autour de 350nmol/l en situation normale et varient jusqu'à 950nmol/l en situation de stress (Webster et al., 2002). Ces molécules diffusent passivement à travers la membrane plasmique pour aller se lier au GCR dans le cytoplasme. Ce dernier est composé d'un domaine N-terminal d'activation de la transcription, un domaine central en doigt de zinc de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine C-terminal de liaison au GC, aux protéines de choc thermique (HSP) et nécessaire à la dimérisation (figure 14) (Nicolaides et al., 2010). Il existe deux isoformes du récepteur de glucocorticoïdes générées par épissage alternatif de l'exon 9 du gène *NR3C1* (Nuclear Receptor Subfamily 3, group C, member 1) situé sur le chromosome 5 humain ou 18 murin (Francke and Foellmer, 1989). Le GRα composé de 777 acides aminés se lie à la corticostérone et est responsable des effets des glucocorticoïdes, alors que la forme β de 742 acides aminés ne lie pas l'hormone corticoïde. Le rôle de cette seconde forme du récepteur n'est pas connue, on la soupçonne de réguler négativement la forme α du récepteur et pourrait avoir un rôle dans la résistance aux thérapies par les corticoïdes (Smoak and Cidlowski, 2004).

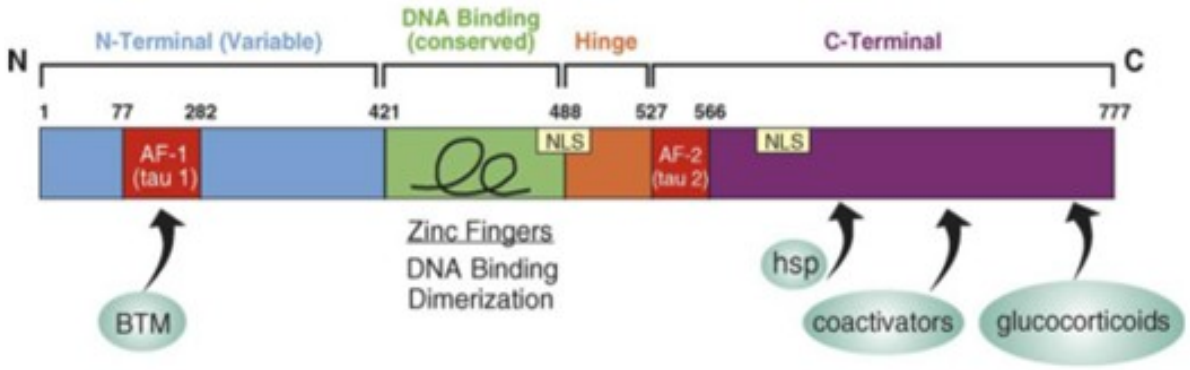


Figure 14 : Organisation du récepteur de glucocorticoïde alpha (GRα)

Le GRα est formé de trois parties distinctes (gauche à droite). La section N-terminale est le domaine de transactivation du récepteur. La section centrale permet la liaison à l'ADN et ses deux régions en doigt de zinc sont hautement conservés et permettent la dimérisation du récepteur. La région C-terminale est quant à elle nécessaire à la liaison avec l'hormone glucocorticoïde ainsi qu'avec les protéines de chocs thermiques (HSP). La partie C-terminale contient aussi les éléments de localisation nucléaire. ***Modifiée de (Smoak and Cidlowski, 2004)***

Lorsque son ligand est absent, le GCR forme un complexe avec des protéines du choc thermique, dont Hsp90/70/56/40 et des immunophilines (Dittmar and Pratt, 1997). La liaison de l'hormone à son récepteur engendre la dissociation du complexe, ce qui découvre les signaux de localisation nucléaires du récepteur et déclenche son homodimérisation et sa translocation au noyau. Une fois dans le noyau, le complexe se lie à l'ADN au niveau d'éléments de réponses aux glucocorticoïdes (GRE) grâce à son domaine en doigt de zinc. Le GCR peut par la suite stimuler ou inhiber la transcription des gènes cibles ou alors se lier à d'autres facteurs de transcription et affecter leurs fonctions.

Pour activer la transcription, le complexe GC-GCR se fixe directement à l'ADN via un GRE de 15 paires de bases situé au niveau de la séquence promotrice du gène cible (figure 15a). Ce mécanisme par lequel les glucocorticoïdes mènent à l'activation des gènes s'applique principalement à ceux contrôlant la gluconéogenèse, la tension artérielle et le catabolisme protéique par exemple (Roumestan et al., 2004). Au niveau clinique, les glucocorticoïdes sont utilisés pour leurs fonctions activatrices du récepteur β2-adrénergique, facilitant ainsi la bronchodilatation dans le traitement de l'asthme (Knox and Pang, 2002). Cette fonction est aussi responsable de nombreux effets secondaires des GC tels que le diabète sucré et l'ostéoporose (Hofbauer and Rauner, 2009). Dans une optique de stress, les fonctions transactivatrices des glucocorticoïdes seraient associées à une situation de stress aigu où la réaction rapide vise la survie de l'organisme.

Le complexe GC-GCR peut aussi inhiber la transcription de gènes cibles selon deux mécanismes. Le premier principe repose sur la liaison du complexe à un élément de réponse négative aux GC (nGRE). Ces nGRE sont reconnus par des facteurs de transcription en absence de glucocorticoïdes et ils seront déplacés par compétition en présence du complexe GC-GCR (Langer and Ostrowski, 1988) (figure 15b). Un exemple de ce mécanisme bien connu est l'expression de l'ostéocalcine, hormone protéique nécessaire à la fixation du calcium, qui possède un nGRE dans sa région promotrice et dont l'expression est inhibée par la présence de glucocorticoïdes (Meyer et al., 1997a).

La seconde méthode de transrépression est plus fréquente et n'implique pas la liaison du complexe glucocorticoïde-récepteur à l'ADN (figure 15c). Dans ce cas, le

complexe GC-GCR réprime les facteurs de transcriptions nécessaires à l'activation de la transcription tels que NF-κB, AP-1 ou STAT5 (Karin and Chang, 2001; Lechner et al., 1997). Il peut exercer cette fonction en se liant physiquement aux facteurs de transcription ou encore en déréglant la cascade menant à l'activation de ces facteurs. L'hormone de stress inhibe ainsi la transcription de nombreuses cytokines inflammatoires telles que l'IL-2 et le TNFα (Hu et al., 2003; Northrop et al., 1992), ce qui sera détaillé dans les sections suivantes.

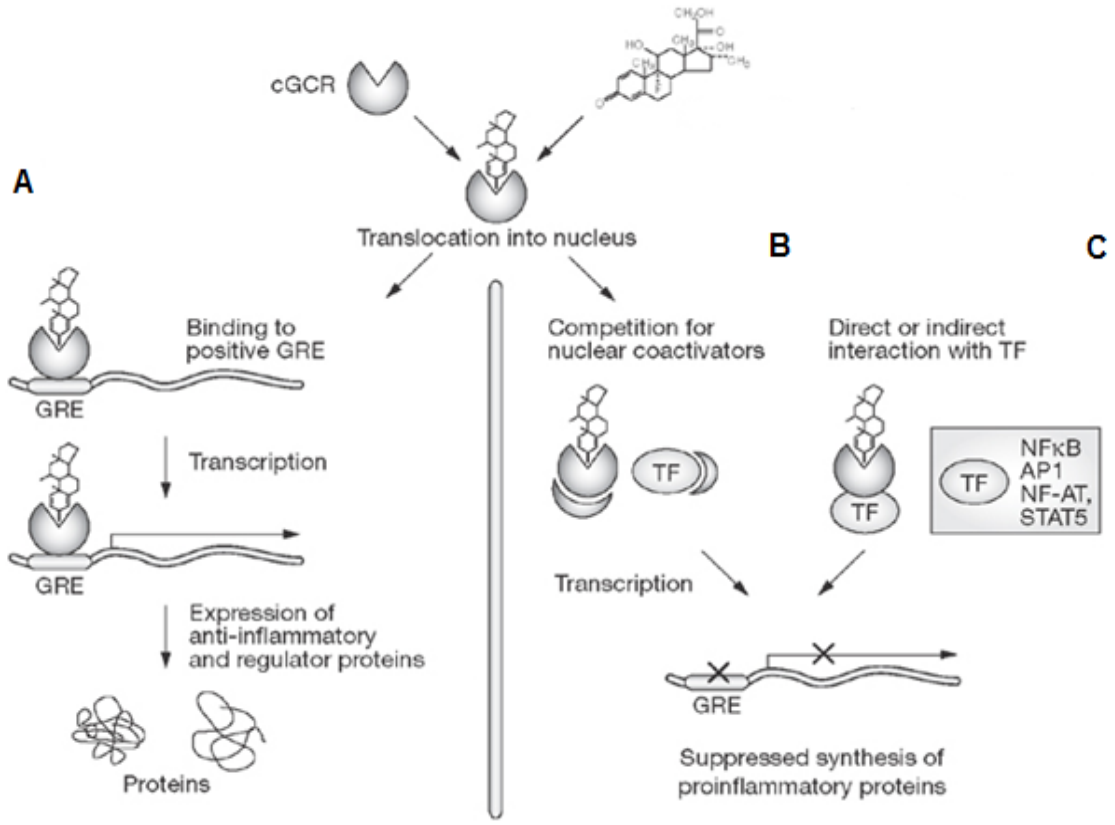


Figure 15 : Effets transactivateurs et transrépresseurs des glucocorticoïdes

A. *La transactivation permet la liaison du complexe GC-GCR à un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) permettant la transcription de gènes de protéines anti-inflammatoires et régulatrices.*

B. *Le complexe GC-GCR peut aussi compétitionner avec certains facteurs de transcription pour les GRE entrainant une inhibition de leurs effets sur les gènes cibles.*

C. *La liaison directe ou indirecte du complexe GC-GCR à différents facteurs de transcription inhibe aussi leur activité transcriptionnelle des protéines pro-inflammatoires, on parle alors de transrépression.*

Open access (Alangari, 2014)

2.5. Impacts de la corticostérone sur le système immunitaire

Lors de l'activation du système immunitaire, les cytokines pro-inflammatoires libérées par les lymphocytes et macrophages activés vont induire une boucle de rétroaction négative en stimulant la sécrétion de CRH par l'hypothalamus (Besedovsky and del Rey, 2000), ce qui induit la sécrétion de corticostérone dans le plasma afin de répondre au stress. En temps normal, la corticostérone exerce un effet anti-inflammatoire et induit une diminution de la réponse immune. Toutefois, en cas de stress chronique, la surexpression de glucocorticoïdes dans le système peut causer de nombreux effets et diminuer la réponse immunitaire de façon prolongée et persistante.

2.5.1. Impacts des GCs sur les fonctions leucocytaires

2.5.1.1. Lymphocytes B et sécrétion d'anticorps

L'impact des glucocorticoïdes sur les lymphocytes B est moins connu et des études récentes ont démontré la présence d'un récepteur des glucocorticoïdes à la surface de ces cellules chez des patients souffrants d'arthrite rhumatoïde (Bartholome et al., 2004). Les effets moléculaires observés à ce jour se situent au niveau de la régulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) régulant l'apoptose. Lorsque ce gène est surexprimé, les lymphocytes pré-B et les cellules de lignées myéloïdes leucémiques seraient protégés contre l'effet proapoptotique des glucocorticoïdes, mais le mécanisme responsable doit être défini plus en détail (Alnemri et al., 1992). Il a aussi été démontré que de fortes doses de dexaméthasone (DEX) – analogue de synthèse des glucocorticoïdes démontrant une affinité plus élevée pour le GCR – diminuent l'expression de la protéine activatrice des cellules B (BAFF « B cell activating factor ») (Zhu et al., 2009). Cette protéine est un membre de la famille du TNF responsable de la survie et la maturation des lymphocytes B. BAFF joue aussi un rôle dans la costimulation des lymphocytes T par les lymphocytes B activés (Youinou and Pers, 2010). Les glucocorticoïdes réduisent la sécrétion d'immunoglobuline E

(IgE), alors qu'ils augmentent l'expression de l'isotype G (IgG) par les lymphocytes B (Ray et al., 1987; Wira et al., 1990). De plus, la présence d'hormone de stress supprime l'activation et la prolifération *in vitro* des lymphocytes B après stimulation avec *Staphyloccus aureus* (Cupps et al., 1985).

2.5.1.2. Cellules dendritiques

L'impact des glucocorticoïdes sur les cellules dendritiques a été largement documenté depuis plusieurs années. L'ajout de DEX sur les cellules dendritiques immatures perturbe leur maturation et leur fonction à la fois *in vitro* et *ex vivo* (Matyszak et al., 2000; Woltman et al., 2000). Le traitement aux GC des cellules dendritiques avant de les mettre en culture avec des lymphocytes T naïfs ou mémoires empêche la restimulation de ces derniers ainsi qu'une diminution de la production d'IFNγ. Cette fonction implique une diminution de l'expression du CMHII et des molécules de costimulation CD80 et CD86 à la surface (Vanderheyde et al., 1999). Plus récemment, il a été découvert que l'ajout de GCs synthétiques aux cellules dendritiques activerait des fonctions tolérogéniques, provoquant autre autres la différenciation des cellules T en lymphocytes T régulateurs (Treg) ainsi que la protection contre les lymphocytes T auto-réactifs ayant réussi à sortir du thymus (Bros et al., 2007; Steinman et al., 2003).

2.5.1.3. Cellules tueuses naturelles (NK)

Ces cellules cytotoxiques sont une composante clé du système immunitaire inné et tuent principalement les cellules infectées par un virus ainsi que les cellules cancéreuses. Leur activité est stimulée par l'interféron γ (IFNγ) et l'interleukine 2 (IL-2), deux cytokines dont l'expression est inhibée par les glucocorticoïdes puisque sous le contrôle des facteurs de transcription AP-1 (Vacca et al., 1992). Ainsi, il a été démontré chez l'homme comme chez la souris qu'en situation de stress physique ou psychologique, l'activité des

cellules NK était diminuée (Bush et al., 2012). Cette diminution des fonctions des cellules NK a été démontrée par une incapacité à se lier à des cellules tumorales ainsi qu'une réduction de la production de granules cytotoxiques (contenant de la perforine et du granzyme B) en présence de glucocorticoïdes à faible dose (10^{-7}M) (Krukowski et al., 2011).

2.5.1.4. Lymphocytes T

Les glucocorticoïdes peuvent affecter la fonction et la survie des lymphocytes T par deux types de mécanismes. Il a récemment été démontré que la transduction du signal par le RCT peut être interrompue en présence de GC, ceux-ci inhibant la phosphorylation de la kinase JNK (Jun kinase N-terminal) et des MAPKs (mitogen-activated protein kinase) en aval du récepteur (Lowenberg et al., 2006). Cependant, la majorité des effets des glucocorticoïdes sur les lymphocytes T découlent de la liaison de l'hormone à son récepteur cytoplasmique.

L'inhibition de la synthèse d'IL-2 est une conséquence importante de l'action des glucocorticoïdes sur les lymphocytes T. L'IL-2 joue un rôle central dans la réponse adaptative primaire en régulant l'activation et la prolifération des lymphocytes et des cellules NK de même qu'en stimulant la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B (Mookerjee et al., 1989). Tel que précédemment mentionné, l'ajout de glucocorticoïdes aux cultures de lymphocytes T cause une inhibition de la transcription du gène de l'IL-2 par la modulation du facteur de transcription *activator of protein-1* (AP-1). AP-1 est connu pour son implication dans la transcription des gènes produisant les facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 ou l'IFNγ (revue dans (Karin and Chang, 2001)). Par une interaction protéine-protéine, le complexe GC-GCR viendrait inhiber la protéine c-fos, et c-jun, composantes d'AP-1, empêchant la transcription de gènes cibles (Zhou and Thompson, 1996).

Les glucocorticoïdes induisent l'apoptose de nombreuses sous-populations lymphoïdes dont les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B et T. Les cellules mononuclées périphériques du sang (PBMCs) stimulés par la concanavalin A meurent massivement par apoptose en présence de glucocorticoïdes alors que les monocytes CD14+CD16+ sont rapidement déplétés après un traitement aux glucocorticoïdes *in vitro* et *in vivo* (Dayyani et al., 2003; Horigome et al., 1997). La régulation de la transcription des protéines de la famille de Bcl-2 est un autre moyen par lequel les GCs peuvent induire l'apoptose. Il a été démontré avec une lignée leucémique (ALL) que l'ajout d'analogue synthétique des glucocorticoïdes provoquait une augmentation de la protéine proapoptotique BIM (Rambal et al., 2009). Plus spécifiquement, la protéine c-jun serait induite par la présence de glucocorticoïdes dans ces cellules leucémiques (Heidari et al., 2012). Rocha-Viegas et coll. (2006) ont rapporté un rôle des GCs dans la diminution du ratio *bcl-*X_L (antiapoptotique)/*bcl-*X_s (pro-apoptotique) dans les lymphocytes T, entraînant ainsi une augmentation de l'apoptose. Ces mêmes auteurs ont aussi identifié que la liaison de Stat5b au complexe GC-GCR était responsable de cette inhibition (Rocha-Viegas et al., 2006).

Finalement, des études sur le stress psychosocial ont aussi démontré une diminution du nombre de lymphocytes T au niveau du sang et de la rate ainsi que de leur capacité migratoire au niveau des organes lymphoïdes (Engler et al., 2004; Stefanski et al., 2003).

2.5.2. Cytokines et TNFRs

Les GCs diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, IL-2, IL-6, TNFα et IFNγ, et augmentent aussi l'expression des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10 (Liu et al., 2009; Moynihan et al., 1998). Ces effets sont principalement dus à l'association du complexe GC-GCR aux facteurs de transcription NF-κB et AP-1.

Le facteur d'activation des protéines 1 (AP-1) et NF-κB sont les principaux cofacteurs s'associant au GCR pour modifier la transcription de leurs cibles. AP-1 est un complexe dimérique composé des protéines oncogènes c-Fos et c-Jun menant à la régulation positive ou négative de la prolifération cellulaire par la transcription des gènes de la cycline D1 ou la répression de gènes tels que p53 (Schreiber et al., 1999; Wisdom, 1999). Au niveau des lymphocytes T, AP-1 peut aussi être responsable de la transcription du gène encodant FasL menant à l'apoptose lorsque lié à son récepteur Fas (Kasibhatla et al., 1998).

NF-κB est un facteur de transcription de nombreux gènes contrôlant l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Lorsque les glucocorticoïdes sont présents dans la cellule, deux mécanismes peuvent conduire à l'inhibition de NF-κB. Le premier est l'interaction directe du complexe GC-GCR avec NF-κB, ce qui bloque sont activité transcriptionnelle (Ray and Prefontaine, 1994). Les GC peuvent aussi augmenter la transcription de la protéine IkB qui empêche la dissociation du complexe NF-κB dans le cytoplasme ce qui prévient la translocation au noyau (Wissink et al., 1997).

2.5.3. Réactivation virale

Les facteurs menant à la réactivation virale sont peu connus. Cependant, de nombreuses études rapportent un lien entre des événements stressant au niveau psychologique, psychosocial ou environnemental et la réactivation virale. Par exemple, il a été démontré chez des modèles animaux que la réactivation d'HSV-1 pouvait être induite par l'irradiation aux UV et l'hyperthermie (Laycock et al., 1991; Sawtell and Thompson, 1992). De plus, l'ajout de DEX – un homologue des glucocorticoïdes – à des cultures neuronales peut provoquer la réactivation du cycle lytique d'HSV-1 et aussi augmente la sensibilité à la réactivation à la suite d'un stress hyperthermique . Toujours au niveau pharmacologique, il est aujourd'hui connu que l'inhalation de fortes doses de glucocorticoïdes dans les cas d'asthme induirait une augmentation des épisodes de réactivation du HSV-1 (Bruning and Samie, 1994). D'autres situations de stress telles qu'un examen oral ou la prise en charge d'un proche handicapé sont aussi

connues pour induire la réactivation virale de l'EBV où l'on peut alors détecter des titres d'anticorps très élevés dans le sang (Glaser et al., 1993). Un test de contrainte physique sur des souris a permis de constater une diminution de l'activation des lymphocytes CD8+ mémoires spécifiques au HSV-1 principalement en réduisant la sécrétion de l'IL-2 et l'IFNγ (Bonneau, 1996; Bonneau et al., 1991).

Peu d'études adressent la question des événements moléculaires spécifiques reliant les hormones sécrétées en situation de stress et la réactivation de virus latent auparavant. Cependant, un GRE a été découvert dans le virus Epstein-Barr et une élévation des gènes responsables de la réplication virale a été observée lors de l'ajout des analogues pharmacologiques des glucocorticoïdes dexamethasone et hydrocortisone (Kupfer and Summers, 1990; Schuster et al., 1991; Yang et al., 2010). Ainsi, une élévation des hormones de stress pourrait mener directement à la réactivation virale de l'EBV.

3. Le système immunitaire dans le contexte spatial

L'espace, pris dans l'optique d'un voyage au-delà de l'atmosphère, est considéré comme un environnement hostile depuis le début des vols habités. Le voyage spatial, du lancement à l'atterrissage de la navette, représente sans équivoque un stress aigu autant sur le plan psychologique que physique. Le corps humain ne peut qu'être affecté par les conditions imposées sur celui-ci, tel qu'une force centrifuge de trois fois la gravité terrestre (3*g*) ou une absence quasi totale de pesanteur (microgravité) en orbite. Ainsi, malgré l'entrainement hors du commun des astronautes triés sur le volet, les voyages spatiaux entrainent des modifications au niveau de tous les systèmes non seulement pendant mais aussi après les vols qu'ils soient de courte ou et de longue durée (revue dans (Williams et al., 2009)).

3.1. Impacts de la microgravité sur la physiologie humaine

3.1.1. Impacts sur le système cardiovasculaire

Les modifications aiguës au niveau du rythme cardiaque et des fluides biologiques sont observables dès le lancement jusqu'aux premières 24 heurs au-delà de

l'atmosphère (Charles and Lathers, 1991). Sur Terre, le cœur pompe plus fortement afin d'assurer l'apport en oxygène au cerveau, alors que les membres inférieurs profitent de la force gravitationnelle pour être irrigués (figure 16). Ainsi, dans les premières heures d'adaptation à l'absence de gravité, un influx sanguin important parvient au haut du corps alors que le volume des membres du bas diminue d'environ 2% puisque la pression sanguine est toujours dirigée contre la gravité terrestre (Leach et al., 1991). Au cours du premier mois dans la Station Spatiale Internationale (SSI), le volume sanguin total des astronautes peut diminuer d'environ 10% dû à une compensation excessive du système cardiovasculaire. De ce fait, le taux d'hématocrite augmente radicalement faisant diminuer la sécrétion d'érythropoïétine, précurseur des globules rouges (Udden et al., 1995).

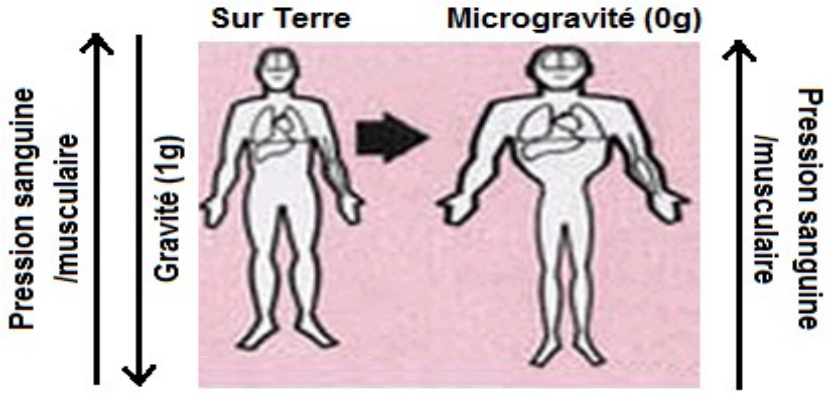


Figure 16 : Impact de la microgravité sur la pression sanguine

Sur Terre (1g, gauche) le cœur irrigue le cerveau en forçant le sang contre la gravité terrestre. En situation de microgravité (0g, droite), le cœur continue à acheminer le sang vers les parties supérieures du corps alors qu'il n'y a plus de force pour contrer cette pulsion ce qui entraîne une enflure du torse, des bras et de la tête. ***Modifiée de http://www.nasa.gov/audience/forstudents/5-8/features/F_When_Space_Makes_You_Dizzy. html***

Un autre effet important de l'adaptation à la microgravité est l'intolérance orthostatique. Suite au retour en gravité normale, le sang se dirige principalement vers le bas du corps ce qui induit vertiges, malaises et parfois des pertes de conscience (Hargens and Richardson, 2009). Le muscle cardiaque et ceux nécessaires à la vasoconstriction des vaisseaux s'atrophient pendant les périodes de microgravité ainsi,

lors du retour sur Terre, le sang n'irriguerait plus adéquatement les membres supérieurs et le cerveau. Cet effet combiné à la réduction du volume plasmatique total expliquerait que la plupart des astronautes ne peuvent rester debout qu'environ 7 minutes à leur retour avant d'éprouver des vertiges, de la tachycardie et même des syncopes (Broskey and Sharp, 2007; Iwasaki et al., 2007).

3.1.2. Impacts sur le système musculo-squelettique

Le système musculo-squelettique est essentiel à la survie sur Terre puisqu'il permet de contrer la gravité en plus de permettre un maintien postural et des mouvements moteurs nombreux et variés. Il n'est donc pas surprenant d'observer une diminution dans la masse ainsi que la force des muscles en absence de gravité puisqu'ils ne sont plus requis pour les fonctions habituelles telles que se déplacer, se tenir en position debout ou assise ou soulever des poids. Cependant, il est beaucoup plus remarquable que dès la deuxième semaine après leur arrivée en microgravité, la masse musculaire d'un astronaute peut avoir diminué d'environ 15% et de plus de 30% après un séjour de 3 à 6 mois (Trappe et al., 2009). Malgré des doses quotidiennes d'entrainement physique intense et des suppléments alimentaires, il semble que les fibres musculaires des membres inférieurs soient plus particulièrement affectées au niveau de leur capacité et de leur force de contraction (Gopalakrishnan et al., 2010).

Il est maintenant connu que la densité osseuse diminue de 1 à 2% par mois dans un environnement de microgravité (LeBlanc et al., 2000). Les os des membres inférieurs et de la colonne vertébrale se déminéralisent et il est alors possible d'observer une augmentation de 60 à 70% de l'excrétion de calcium dès les premiers jours dans la SSI (Buckey, 2006). Il a aussi démontré que l'absorption de calcium par l'intestin ainsi que les niveaux d'ostéocalcine – un marqueur de la formation osseuse – et de vitamine D étaient significativement diminués pendant les vols spatiaux (Smith et al., 2005).

Outre l'absence de gravité, plusieurs autres phénomènes peuvent être à la source des modifications physiques et biochimiques observées à la fois pour les systèmes musculaire et squelettique. Une nutrition sous-optimale ainsi qu'une

diminution de la lumière ambiante – nécessaire à l'apport en vitamine D – pourraient expliquer certains déficits (Stein, 2001). Une désynchronisation des rythmes circadiens ainsi que le stress physique et psychologique important imposés aux astronautes pourraient aussi modifier la régulation des gènes et hormones essentiels à la protection et à la récupération du système musculo-squelettique en apesanteur.

3.1.3. Impacts sur le système immunitaire

Les modifications au niveau du système immunitaire ont été observées dès le début des missions habitées en orbite (Ginsberg, 1971). Aujourd'hui, de nombreuses données ont été rapportées quant à la fonction du système immunitaire des astronautes à leur retour sur Terre, mais très peu d'informations sont disponibles quant à la réponse immunitaire durant le vol spatial et encore moins sur les mécanismes en causes. La section ci-dessous mettra aussi en évidence de nombreuses variations dans les résultats obtenus à ce jour, principalement causées par des différences dans les méthodologies ou les conditions du vol spatial.

3.1.3.1. Sous-populations leucocytaires

Une tendance retrouvée chez la majorité des astronautes à leur retour sur Terre est une variation dans la distribution des sous-populations leucocytaires (Bakos et al., 2001; Crucian et al., 2012; Crucian et al., 2011; Crucian et al., 2008; Morukov et al., 2011). Cependant, les observations d'une expérience à l'autre dû, entre autres, à des conditions de vol différentes ou au faible nombre de participants par expérience. Une étude sur les facteurs d'adhésion moléculaires pouvant être à l'origine de la redistribution des leucocytes, a montré chez des animaux ayant séjournés 10 jours dans l'espace que l'expression de LFA-1, nécessaire au recrutement des leucocytes aux sites infectés, était plus élévée au niveau des cellules de la rate et diminuée dans les ganglions lymphatiques (Grove et al., 1995). L'expression du CD62L, un facteur de localisation nécessaire aux lymphocytes pour pénétrer les organes

lymphoïdes secondaires, est quant à elle diminuée à la fois dans la rate et dans les ganglions lymphatiques chez ces mêmes animaux.

Une augmentation importante du pourcentage de neutrophiles ainsi qu'une diminution significative de leur capacité de phagocytose ont été observées lors des missions spatiales (Kaur et al., 2004). Bien que les résultats concernant la variation du nombre de monocytes chez les astronautes soient controversés, une diminution de leur fonction a systématiquement été démontrée après un séjour en orbite. La capacité à phagocyter la bactérie *E.coli*, à induire une réponse oxydative ainsi qu'à se dégranuler suite à une restimulation *in vitro* était aussi significativement diminuée chez les astronautes en comparaison avec des contrôles restés sur Terre (Kaur et al., 2005).

D'importantes variations au niveau de la fonction des cellules NK ont été observées chez les astronautes. Majoritairement, les résultats rapportent une diminution de la fonction cytotoxique des cellules NK pendant et après un épisode de microgravité réel ou simulé (Konstantinova et al., 1995; Rykova et al., 1992). Quelques études sur la cytotoxicité *in vitro* des NK suggèrent aussi que leur capacité à se lier aux cellules cibles serait diminuée dans le contexte spatial (Meshkov and Rykova, 1995). Certains auteurs avancent aussi qu'une diminution de la production de l'IL-2 nécessaire à leur multiplication ainsi que d'IFNγ nécessaire à leur activation serait responsable de ces observations (Borchers et al., 2002; Licato and Grimm, 1999).

Les altérations majeures observées *in vivo* et *in vitro* en situation de microgravité se situent au niveau du nombre et de la fonction des sous-populations lymphocytaires. Une diminution dans la capacité de prolifération des lymphocytes T à la suite d'un voyage spatial a été observée chez le rat et l'homme depuis de nombreuses années (Crucian et al., 2008; Morukov et al., 2011; Taylor and Dardano, 1983). Ces lymphocytes ayant séjourné dans un environnement de gravité quasi nulle présentent une déficience dans leur

capacité de prolifération suite à une stimulation par le RCT (aCD3/aCD28) ou par la phytohemaglutinine (PHA) et l'ionomycine.

Le nombre de chacune des sous-populations lymphocytaires observé après un séjour en microgravité varie considérablement d'une étude à l'autre dû à la difficulté d'accès aux astronautes à leur retour sur Terre ainsi qu'à la grande variabilité interindividuelle. Par exemple, une étude effectuée à partir de sang d'astronautes ayant séjourné à long terme en microgravité a démontré une diminution générale des pourcentages de lymphocytes T et de leur capacité à être restimulé *in vitro*, une augmentation du nombre de lymphocytes B, ainsi qu'une diminution significative de la population de NK (Crucian et al., 2008). Quelques années plus tard, une étude du même type a été effectuée dans des conditions similaires et a démontré un effet inverse, c'est-à-dire une augmentation significative du nombre de lymphocytes T et de leur capacité à exprimer les marqueurs d'activation CD69/CD25 après restimulation *in vitro* (Morukov et al., 2011). Cependant, une majorité d'études semblent confirmer une diminution du nombre de lymphocytes T suite à un voyage spatial (Crucian et al., 2013; Crucian et al., 2008; Gridley et al., 2006; Gridley et al., 2009). . Bien qu'une diminution dans le pourcentage et le nombre absolu de lymphocytes CD4+ et CD8+ mémoires a été observés après un voyage spatial de longue durée, aucune différence significative n'a été observée au niveau des ratios des sous-populations centrales et effectrices les constituants (Crucian et al., 2012; Morukov et al., 2011). Encore à ce jour, peu d'auteurs se sont penchés spécifiquement sur la fonction immunitaire mémoire en microgravité

Un phénomène observé de façon répétitive lors des voyages spatiaux est la diminution de l'hypersensibilité retardée (*delayed-type hypersensitivity* (DTH)). Ce type d'expérimentation est souvent effectué afin de tester la réponse immunitaire cellulaire T. En situation immunitaire normale, les macrophages phagocytent et présentent l'antigène menant à sa reconnaissance par les cellules T CD4+ auxiliaires qui sécrètent de l'IL-2 et de l'IFNγ

nécessaires à la réponse cytotoxique CD8+ (Uzzaman and Cho, 2012). Ainsi, des antigènes ont été injectés de façon sous-cutanée à différents astronautes afin de vérifier leur réponse immunitaire avant, pendant et après un vol spatial (Gmunder et al., 1994; Taylor and Janney, 1992). De façon significative, la réponse immunitaire à un antigène cible était diminuée après un voyage en microgravité appuyant les résultats démontrant un déséquilibre de la fonction immunitaire adaptative dans l'espace.

Les mécanismes pouvant mener à l'immunodéficience durant les vols spatiaux sont mal connus. Une analyse génomique de lymphocytes T activés a permis d'identifier de nombreux gènes inhibés en situation de microgravité simulée ou à bord de l'ISS (Boonyaratanakornkit et al., 2005; Chang et al., 2012). Chang et coll. (2012) ont ainsi identifié 47 gènes dont l'activité était diminuée de plus de deux fois en absence de gravité, incluant les gènes liés à la voie de signalisation du TNF. Ils ont démontrés que la fonction des facteurs de transcription responsable de l'activation des cellules T et de la sécrétion de plusieurs cytokines tels que NF-κB, CREB, AP-1 et STAT est affectée par la microgravité. Une analyse détaillée a aussi permis de constater que l'expression du CD69 et CD83 lors de l'activation des lymphocytes T et B respectivement était significativement réduite, confirmant ainsi les résultats obtenus par d'autres groupes. De plus, l'expression du gène du TNF et de la chimiokine CCL3 nécessaire au recrutement de cellules polynucléées au site d'infection était réprimée par 15 et 6 fois respectivement. Le TNFSF9 (4-1BBL), nécessaire au maintien et à la survie des lymphocytes T CD8+ mémoires, fait aussi partie des gènes les plus réprimés dans l'environnement spatial (Chang et al., 2012).

3.1.3.2. Hormones et cytokines

Les cytokines retrouvées dans le sang représentent un des principaux champs d'investigation des recherches immunologiques spatiales. Une diminution significative de la production d'IFNγ et d'IL-2 a été observée chez

les astronautes et les rongeurs au retour sur Terre depuis le tout début des voyages spatiaux habités (Sonnenfeld et al., 1988). Des études d'alitement « bed-rest » où le participant reste couché avec la tête vers le bas selon un angle de 6° (figure 18A),ont aussi confirmé l'impact de la gravité réduite en démontrant une capacité réduite pour les lymphocytes T stimulés *in vitro* avec de la PHA à sécréter de l'IL-2 (Schmitt et al., 1996; Uchakin et al., 1998). Les niveaux de production d'INFγ, de TNFα et d'IL-1 sont aussi diminués radicalement au niveau des leucocytes sanguins stimulés en apesanteur par l'ajout d'IL-2 (Licato and Grimm, 1999). Cette dernière observation a mené à la découverte d'un déficit des lymphocytes T à augmenter l'expression de la chaine alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25) lorsque mis en culture en microgravité. La diminution de la production d'IFNγ semble être plus importante pour la sous-population des lymphocytes T CD4+ que pour les CD8+, cet effet pouvant cependant être dû à une réduction du nombre absolu de lymphocytes T CD8+ en microgravité (Crucian et al., 2000).

La majorité des études traitant des cytokines en microgravité sont analysées en fonction du ratio IFNγ:IL-10. Ainsi, la majorité des différences significatives observées pendant ou après un voyage spatial indiquent une diminution des cytokines proinflammatoires responsables de la réponse immunitaire cytotoxique et auto-immune telles que l'IFNγ, l'IL-2 et le TNFα. À l'opposé, la concentration des cytokines de type Th2 ayant des propriétés anti-inflammatoires telles que l'IL-10, ou l'IL-4 et l'IL-6 qui stimulent la réponse humorale, augmente à la suite d'un vol spatial (Crucian et al., 2008).

Certains auteurs ont avancé que les changements observés au niveau de la prolifération lymphocytaire ainsi que la production des cytokines pourraient être dus au stress imposé par les voyages spatiaux (Meehan et al., 1993; Rai and Kaur, 2011; Stowe et al., 2003). Le taux de cortisol sanguin d'astronautes devant partir pour un long voyage est élevé de façon significative environ 15 jours avant leur départ démontrant leur niveau élevé de stress (Stowe et al., 2011b). Par la suite, des niveaux élevés de cortisol, adrénaline et noradrénaline

ont été détectés dans le sang et l'urine d'astronautes au cours des premiers jours suivants leur départ dans l'espace, de même qu'à leur retour (Leach et al., 1996; Stowe et al., 2003). Cependant, ces changements semblent s'inverser lors d'un vol spatial de longue durée où le niveau de cortisol augmente et celui des catécholamines diminue. Ainsi, les niveaux de cortisol sanguin et urinaire observés après un court séjour en microgravité étaient significativement diminués alors que ceux de l'adrénaline étaient augmentés et, à l'inverse, le taux de cortisol sanguin était plus élevé que celui des catécholamines après un long séjour à bord de l'ISS. Ces différences pourraient s'expliquer par une adaptation du système à plus long terme où les hormones de stress dites « de survie » soit l'adrénaline et la noradrénaline diminuent et le cortisol s'élève, signe d'un stress chronique.

L'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire provoque des effets similaires à ceux rapportés après un voyage spatial. Par exemple, les glucocorticoïdes sont bien connus pour leur effet anti-inflammatoire tels que la modulation de l'expression des cytokines IL-2, TNFα et IFNγ et l'augmentation des niveaux d'IL-4 et IL-10, tout comme il a été observé dans de nombreux voyages spatiaux (Richards et al., 2000; Salicru et al., 2007). L'étude récente de Chang et coll. démontrant une diminution significative des gènes cibles de la voie de signalisation en aval des récepteurs du TNF durant le vol spatial concorde aussi avec l'impact des glucocorticoïdes sur la signalisation de la voie NF-κB (Chang et al., 2012; Ray and Prefontaine, 1994). Bien que très peu d'information soit connue concernant les voies de signalisation impliquées dans la variation de la fonction et de la migration des cellules T et NK en microgravité, la réduction du nombre et de la capacité cytotoxique des ces sous-types de leucocytes ressemblent aux effets imputables au stress chronique sur Terre.

3.1.3.3. Réactivation virale

La réactivation virale chez les astronautes a été étudiée de façon intensive. Avant la mise au point des quarantaines imposées aux astronautes avant les vols, des abcès cutanés, des infections des voies respiratoires et urinaires ainsi que des infections par *Staphylococcus aureus* avaient été rapportés à la suite des vols en orbite (Pierson et al., 1996). Au milieu des années 1970, la majorité des astronautes de la mission Apollo ont développé une infection pendant leur vol ou dans les quelques jours suivants leur retour (Hawkins et al., 1975). Par la suite, la réactivation des virus de la famille de l'herpès (EBV, CMV et VZV) a été observée pendant et après des vols spatiaux sur des sujets humains ou des souris de même qu'à la suite d'étude de microgravité simulée (Cohrs et al., 2008; Mehta et al., 2000; Pierson et al., 2005; Uchakin et al., 2007).

Le taux d'anticorps spécifiques à la capside virale d'EBV dans le sang augmente de façon significative en microgravité et peut varier de façon importante allant jusqu'à une augmentation de 64 fois par rapport au niveau observé avant le vol (Stowe et al., 2000). Cette réactivation de la réplication du virus est souvent observée de façon concomitante avec des niveaux élevés de cortisol et de catécholamines dans les urines ou le sang (Stowe et al., 2001). Une modification dans les niveaux d'expression des différentes cytokines plasmatiques – soit à la baisse ou a la hausse – est observée chez la quasi-totalité des sujets dont les virus EBV, CMV ou VZV ont été réactivés durant leur séjour en microgravité (Mehta et al., 2013; Uchakin et al., 2007).

3.2. Diagnostic et suivi médical *in situ*

3.2.1. Modèles analogues pour l'étude des effets de la microgravité à bord de l'ISS

Le besoin d'assurer la sécurité des vols habités dans l'espace et le petit nombre d'astronautes ont poussé les chercheurs en sciences de la vie de l'espace à élaborer diverses méthodes afin de simuler les effets de la microgravité sur Terre.

Les études de suspension des membres inférieurs chez les animaux (*hindlimb unloading*) (figure 17) ont permis d'obtenir plusieurs réponses sur l'impact de la microgravité sur les systèmes physiologiques. Des rongeurs peuvent être suspendus par la queue afin que leurs pattes arrière ne touchent plus le sol, reproduisant ainsi l'effet de la microgravité. Les populations de lymphocytes de la rate et du thymus sont alors significativement réduites alors que les niveaux de catécholamines sont plus élevés que chez les animaux contrôles (Aviles et al., 2005). Cette réduction peut être bloquée par l'injection d'antagonistes des récepteurs stéroïdiens, appuyant le lien entre les corticostéroïdes et les impacts sur le système immunitaire en situation de gravité réduite (Wei et al., 2003). Ces études ont aussi permis d'observer une plus faible réponse immune aux antigènes tumoraux, visibles par une augmentation de la croissance tumorale chez les souris soutenues la tête vers le sol (Lee et al., 2005).

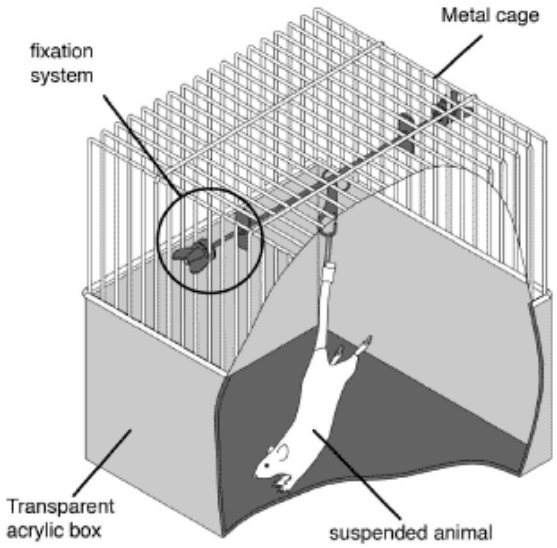


Figure 17 : Études de suspension des membres inférieurs

Afin d'étudier les impacts de l'absence de gravité sur in vivo, *il est possible de suspendre des souris par la queue dans des cages spécialement prévues à cet effet afin que leurs membres inférieurs ne touchent plus au sol.* ***Modifiée de (Shimano and Volpon, 2007)***

Les études de d'alitement permettent d'étudier l'impact de la microgravité chez les sujets humains allongés de façon prolongée avec la tête vers le bas selon un angle de 6°C (figure 18a from ESA). Cette méthode permet d'effectuer des prises d'échantillons sanguins et salivaires de façon régulière pendant la période de microgravité simulée, ce qui représente une difficulté majeure pendant les vols

spatiaux. Ainsi, des modifications des niveaux de cytokines dans le sang ont été observées après seulement 7 jours d'alitement et la fonction des lymphocytes B et T, des cellules NK et des monocytes était altérée significativement après stimulation *in vitro* (Murdaca et al., 2003; Uchakin et al., 2002; Xu et al., 2013). Ces mêmes résultats ont aussi été obtenus *in vitro* à l'aide de clinostats, un appareil permettant d'effectuer des rotations aléatoires simulant la microgravité (figure 18b) ainsi que lors d'expéditions dans l'Arctique afin de simuler les effets psychologiques du confinement et de l'éloignement (Crucian et al., 2007; Thiel et al., 2012).

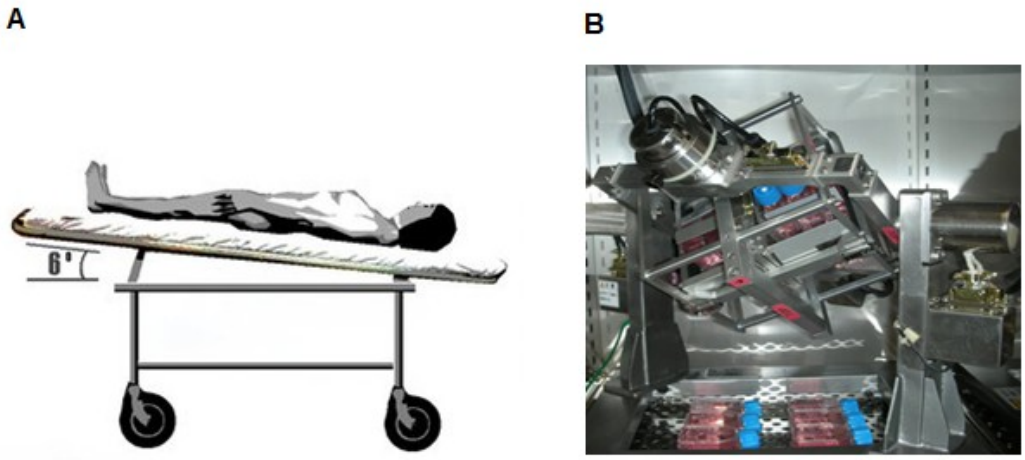


Figure 18 : Modèles d'études de l'impact de la microgravité

A. *Études d'alitement sur des patients allongés tête vers le bas selon un angle de 6°* **(http://www.esa.int/Our_Activities/Human_Spaceflight/Bedrest_studies/History)**

B. *Études* in vitro *permettant d'effectuer des rotations aléatoires simulant la microgravité sur les cellules en culture.* **(Serova and Denisova, 1982)**

Les vols paraboliques représentent aujourd'hui une étape essentielle dans l'étude des sciences de la vie dans l'espace (figure 19). À l'aide d'avions spécialisés effectuant des paraboles répétitives, il est possible d'obtenir de courtes périodes – environ 20 secondes – de chute libre reproduisant les conditions d'apesanteur en orbite. Différentes expériences peuvent alors être tentées afin d'obtenir des échantillons ou de valider des techniques qui iront par la suite rejoindre la SSI pour une période de microgravité prolongée.

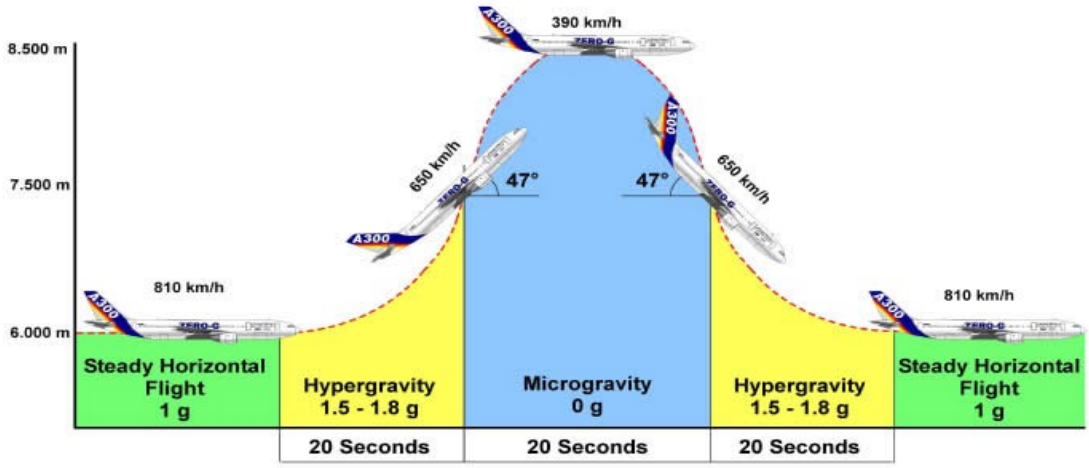


Figure 19 : Paramètres d'un vol parabolique
Image de l'Agence Spatiale Européenne (ESA) http://www.spaceflight.esa.int/impress/text/education/Microgravity/Producing_Microgravity.html

3.2.2. Plateformes de biodiagnostic existantes

La Station Spatiale Internationale (SSI) sert de laboratoire à la fine pointe de la technologie en sciences spatiales. Elle est équipée de nombreuses plateformes permettant d'effectuer de la recherche fondamentale telles que le MDS (Mice Drawer System, NASA) ou le BIOLAB (ESA), mais très peu permettent d'effectuer un diagnostic médical *in situ*. Le LOCAD-PTS, qui a été testé par la NASA, permet la détection de substances microbiennes sur les surfaces de la station spatiale, cependant il n'est plus en fonction à l'heure actuelle (Morris et al., 2012). L'appareil i-STAT développé par la compagnie Abbott a aussi démontré qu'il était possible d'analyser quelques paramètres sanguins en orbite, quoique la durée de vie limitée des réactifs limite son utilisation (Smith et al., 1997). La seule plateforme d'imagerie médicale à bord de la SSI est l'ADUM (Advanced Diagnostic Ultrasound in Microgravity). Cet appareil de télémédecine permet aux astronautes d'effectuer eux-mêmes des analyses par ultrasons avec une formation médicale minimale (Sargsyan et al., 2005). Le SLAMMD (Space Linear Acceleration Mass Measurement Device) est utilisé pour mesurer la masse des astronautes en cours de vol ((NASA), 2014). Cette plateforme permet aussi de traiter les différents échantillons sanguins qui seront par la suite

réfrigérés où congelés dans d'autres compartiments de la SSI. Un système de fonction pulmonaire est aussi disponible afin de tester la capacité respiratoire des astronautes alors que des dosimètres sont portés tout au long du séjour afin d'enregistrer le niveau de radiation accumulé par le corps (Green et al., 2005). Cependant, aucune plateforme permettant le traitement et l'analyse d'échantillons biologiques n'est actuellement disponible dans la SSI.

3.2.3. Cytométrie en flux

L'idée d'une plateforme de cytométrie à bord de la SSI a été avancée il y a de nombreuses années sans succès à ce jour (Jett et al., 1984). Dans l'optique d'un voyage prolongé vers des planètes éloignées telle que Mars, ou d'une habitation prolongée sur la Lune, un appareil permettant d'obtenir des informations phénotypiques, cellulaires, hormonales et enzymatiques serait un atout sinon une nécessité. Actuellement, les échantillons biologiques prélevés dans la SSI doivent être congelés puis rapportés sur Terre avant de pouvoir être analysés. Ainsi, une plateforme capable de lyser, fixer et marquer les échantillons puis de les analyser en cytométrie en flux directement dans l'espace permettrait une évaluation rapide et efficace de la santé des astronautes. Il pourrait être possible d'évaluer par exemple, l'état musculo-squelettique par les niveaux de calcium et d'ostéocalcine dans le sang et les urines, la fonction cardiovasculaire grâce au niveau de créatine et la fonction immunitaire par les titres de virus pouvant se réactiver tels que l'EBV, le HSV et le VZV. Ce type d'appareil pourrait aussi permettre d'évaluer les traitements pharmacologiques imposés aux astronautes afin de mieux comprendre la métabolisation des médicaments ou suppléments nutritionnels. Un appareil permettant d'effectuer un compte absolu des différentes sous-populations leucocytaires serait aussi un atout majeur afin de diagnostiquer une diminution de la fonction immunitaire ou une infection ainsi qu'évaluer les impacts des radiations sur l'ADN des astronautes en vol.

Un premier essai de cytométrie en flux en microgravité a été effectué en vols paraboliques par une équipe de la NASA avec des résultats prometteurs (Crucian and

Sams, 2005). Des essais d'immunophenotypage de leucocytes ont été effectués avec succès, permettant de différencier les sous-populations de granulocytes, monocytes, lymphocytes B et T CD4+/CD8+ et les moyennes de fluorescences (MFI) obtenues étaient comparables avec un cytomètre commercial au sol. L'appareil a aussi effectué un calcul du nombre absolu de leucocytes provenant du sang total avec un succès relatif puisque les comptes étaient systématiquement 20% sous les résultats attendus. Cependant, ces résultats sont explicables par le fait que le volume analysé par le cytomètre était calculé par les expérimentateurs plutôt que par l'appareil lui-même. De plus, les coefficients de variation tirés des résultats obtenus étaient significativement plus élevés en situation de microgravité, indiquant que malgré sa capacité d'analyse adéquate, cette nouvelle plateforme avait une légère perte de résolution en absence de gravité.

Hypothèse et objectifs

Le voyage spatial et l'absence de gravité sont reconnus comme induisant un stress important sur les systèmes physiologiques et plus particulièrement sur la fonction immunitaire. Le vol spatial a été maintes fois associé à une élévation du niveau des hormones de stress telle que le cortisol, ces hormones étant par ailleurs connues pour induire une immunosuppression et une augmentation de la probabilité de réactivation virale, phénomène observé chez la majorité des astronautes. Or, la présence de lymphocytes CD8+ mémoires joue un rôle fondamental dans le contrôle de la réactivation de virus latents. Ainsi, nous avons élaboré l'hypothèse que les hormones de stress produites durant le vol spatial diminuent la réponse adaptative mémoire, provoquant une sensibilité accrue aux infections et aux réactivations virales chez les astronautes.

Afin de tester cette hypothèse, le premier objectif de cette étude était de développer un modèle murin afin de confirmer l'influence de la corticostérone, analogue murin du cortisol, sur la fonction des lymphocytes T CD8+ mémoires. Ce modèle sera aussi utiliser pour étudier les éléments de signalisation responsable de la survie et de la fonction des lymphocytes T CD8+ mémoires en présence de corticostérone.

Un deuxième objectif était d'identifier les facteurs impliqués dans l'effet du stress sur la fonction mémoire durant les vols spatiaux, afin de produire une liste de marqueurs qui pourraient être étudiés en temps réel durant les missions spatiales. Pour cette analyse, une plateforme miniaturisée de cytométrie en flux sera développée en collaboration avec l'Institut National d'Optique (Québec) puis testée dans l'environnement de la station spatiale internationale. Ces données et cette technologie pourront alors ouvrir la voie vers une future expérience effectuée dans le cadre de la station spatiale.

Article Scientifique 1

Corticosterone signaling in central memory CD8+ T cells triggers apoptosis that is inhibited by interleukin-15

Geneviève Dubeau Laramée, Luchino Y. Cohen, Laurent Sabbagh.

Résumé

La mémoire immunologique joue un rôle essential dans la protection de l'organisme contre les agents pathogènes. Les lymphocytes T CD8+ mémoires permettent de reconnaître et d'éliminer rapidement ces pathogènes ayant déjà infectés l'organisme en plus de maintenir latents certains virus chroniques chez l'hôte. Cependant, certaines situations telles qu'une diminution de la fonction immunitaire ou le stress chronique peuvent favoriser la réactivation de ces virus. Nous avons démontré que la corticostérone, hormone de stress chez la souris analogue au cortisol humain, induit l'apoptose des lymphocytes T CD8+ mémoires. L'interleukine 15 (IL-15), une cytokine essentielle à l'homéostasie des lymphocytes T, permet d'inhiber l'apoptose induite par la corticostérone de façon dose-dépendante. L'IL-15 et les voies de signalisation des glucocorticoïdes ont été étudiés afin d'expliquer l'effet inhibiteur de cette cytokine. L'expression des protéines NF-κB, IκBα et Bim ne varient pas de façon significative lorsque des lymphocytes T CD8+ mémoires sont mis en contact avec de la corticostérone *in vitro*. Cependant, l'expression du GITR, un membre de la famille des récepteur du TNF (TNFR) augmente significativement en présence d'IL-15 et ce, de manière dose-dépendante. Puisque GITR est nécessaire à la survie des lymphocytes T CD8+ mémoires *in vivo*, nos résultats suggèrent que ce récepteur pourrait être impliqué dans la capacité de l'IL-15 à inhiber l'apoptose des lymphocytes T CD8+ stimulée par les glucocorticoïdes.

Abstract

Immunological memory plays a vital role in monitoring the body against specific pathogens. The CD8+ memory lymphocytes allow recognizing and quickly eliminating any threat previously encountered in addition to keeping latent some chronic viruses in the host. However, certain situations such as chronic stress decrease immune function and could thereby promote viral reactivation. We demonstrate here that the stress hormone corticosterone, a cortisol analog in mice, induces apoptosis in CD8+ memory T cells. Interleukin-15 (IL-15), a cytokine essential for the homeostasis of memory T cells rescues corticosterone-induced apoptosis in a dose-dependent manner. IL-15 and glucocorticoids signaling pathways were investigated to explain the inhibitory effect of this cytokine. NF-κB, IκBα and Bim protein expression did not vary significantly when memory lymphocytes were cultured with corticosterone. However, expression of the glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR), a member of the TNF receptor family, did significantly increase in presence of IL-15 in a dose-dependent manner. Since GITR is required for the survival of memory CD8 T cells *in vivo*, this suggests that it may be involved in the capacity of IL-15 to counter glucocorticoid-induced apoptosis of CD8 memory T cells.

Introduction

Small populations of effector memory CD8 T cells (Tem) have been identified in the vicinity of neurons infected by the HSV-1, an alpha-herpesvirus (Decman et al., 2005). The same type of immune surveillance has been observed in cases of latent infection with CMV and EBV, beta- and gamma-herpesviruses respectively (Appay et al., 2002; Seckert et al., 2012). In each case there are a small proportion of memory CD8 T cells surrounding the reservoir of latent viruses, even if there is no active production of virions. These effector memory T cells also present a certain cytotoxic capacity confirmed by their production of IFNγ and non-lytic granules. Among the physical, psychological and environmental stimuli which trigger the reactivation of latent viruses, most involve a stress imposed on the organism. For example, UV exposure and hyperthermia induce the proliferation of HSV-1 (Laycock et al., 1991; Sawtell and Thompson, 1992). Verbal and mental examinations, shift working as well as space missions have all been identified as conditions leading to the reactivation of EBV, detectable by high viral titers in the blood (Glaser, 1999; Glaser et al., 1993; Stowe et al., 2011a).

Immunological memory is essential to protect the organism against repeated exposure to the same infectious pathogen or chronic viral reactivation. Recent studies have shed light on the factors governing the survival and homeostasis of antigen-specific memory T cells, emphasizing the role of specific cytokines and receptors of the TNFR family (Osborne and Abraham, 2010; Sabbagh et al., 2007). Interleukin-15 (IL-15) is known to regulate cell proliferation, activation and differentiation of CD8+ lymphocytes and NK cells (Verbist and Klonowski, 2012). This member of the γc cytokine family binds to a specific cell surface receptor (IL-15-R) composed of three subunits: IL-2Rβ, IL-2Rα (γc) and IL-15Rα (Lodolce et al., 2002). This cytokine can also be trans-presented by the IL-15Rα chain to a cell expressing both the IL-15Rα and the common cytokine-receptor γ-chain (γc). Its role in promoting CD8+ memory T cell homeostatic proliferation and survival in the absence of antigen has been demonstrated using IL-15Rα$^{-/-}$ and IL-15$^{-/-}$ mice. These genetic models displayed a significant reduction in memory phenotype CD8^{+}CD44^{high} T cell survival and proliferation. In addition, mice deficient in IL-15 produce a small number of CD8 memory cells in response to infection and this population has a proliferative defect in the absence of antigen.

Stress leads to the secretion of steroids hormones, mainly glucocorticoids (GCs), by the adrenal glands. Binding of GCs to the GC receptor (GCR) represses the transcription of proinflammatory cytokines and chemokines genes such as IL-2, TNFα, IFNγ and RANTES (Liu et al., 2009). These effects are caused by the interaction of the GC-GCR complex with the NF-κB signaling pathway through direct interaction with NF-κB or upregulation of IκBα, an inhibitor of NF-κB activation (Amsterdam et al., 2002; Auphan et al., 1995).

GCs have also an important immunosuppressive effect as they trigger apoptosis in multiple cell types such as CD4+CD8+ thymocytes, osteoclasts, dendritic cells, and T cells (Iwata et al., 1991; Murosaki et al., 1997). The mechanisms involved in GCs-induced apoptosis are poorly understood; however Bcl-2 and Bcl-x_L inhibition and increased Puma and Bim expression are potentially involved (Erlacher et al., 2005; Heidari et al., 2012; Ploner et al., 2008). GCs also inhibit IL-2 secretion and JAK-Stat signaling in T cells by interfering with Stat5 DNA binding upon IL-2 stimulation (Bianchi et al., 2000).

These results suggest that GCs could affect the survival of memory CD8 T cells which could explain the relation between elevated stress levels and viral reactivation. This study was undertaken to determine the impact of a stress hormone (corticosterone) on central memory CD8+ T cells *in vitro*. The results show that corticosterone induces apoptosis in resting memory T cells and that the addition of IL-15 has a potent dose-dependent anti-apoptotic effect.

Materials and Methods

Mice

OT-I mice (Hogquist et al., 1994) were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mice were maintained under specific pathogen-free conditions in sterile microisolator caging. All mice experiment protocols were performed following the Canada Council on Animal Care (CCAC) guidelines and were approved by the Maisonneuve-Rosemont animal care committee.

Lymphocyte isolation, stimulation and survival assay

Splenocytes were purified after red blood cells lysis of total spleen from OT-I mice using ammonium-chloride-potassium lysing buffer (ACK). They were cultured ($5x10^6$cells/ml) in complete RPMI medium (RPMI 1640 with L-glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin 10000 units/mL, 1% streptomycin 10000 ug/mL, 0.1% β-2-mercaptoethanol, 1% non essential amino acids (NEAA) 100X, 1% sodium pyruvate 200mM, and 1% Hepes 1M) and stimulated with SIINFEKL peptide of ovalbumine (0.1µg/ml) (provided by Dr. N.Labrecque) for 18h in a 6-well plate at 37°C/5% CO_2. After washing excess peptide, the cells were cultured for 48h at $1.5x10^6$cells/ml in complete medium. On the 3rd day after activation, density gradient centrifugation (Lympholyte-M, Cedarlane, Ontario, Canada) was used to isolate live $CD8^+$ T cells. Flow cytometry analysis confirmed that the purity of live CD8+ T cells was >90%. The percentage of live cells was assessed using Trypan blue exclusion.

Central memory $CD8^+$ T cells generation and stress assay

Activated $CD8^+$ T cells were cultured in 6-well plates (10^6 cells/ml) in the presence of 20ng/ml of human recombinant IL-15 (R&D Systems, Ontario, Canada) for 6 days as described previously by Pulle et al. (2006). Analysis of T cell survival, activation and memory differentiation was performed by flow cytometry as described below. Once the phenotype of resting memory T cells was confirmed, they were placed in culture (10^6cells/ml) with increasing concentrations of IL-15 as indicated, and in the presence of 10^{-6}M of corticosterone

(Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) or the same concentration of carrier (DMSO) before assessment of cell viability by flow cytometry.

Flow cytometry

Surface staining for flow cytometry assays was done using anti-CD8α-PerCP, anti-CD62L-FITC, anti-CD44-APC, anti-CD69-PE (BD Pharmigen, Ontario, Canada). Apoptosis levels were assessed by staining with Annexin-V-APC (BD Pharmigen) and propidium iodide (PI, company). Flow cytometry data was acquired on a FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA) and analysis was performed with the FlowJo software (TreeStar, OR, USA).

Western blot analysis

Aliquots of 10^6 $CD8^+$ T cells were harvested from cell cultures, centrifuged and stored at -20°C until analysis. After thawing, cell pellets were resuspended in lysis buffer for nuclear extraction (1% NP-40, 0.05M Tris HCl 50mM, 0.15M NaCl 150mM, 0.25% Na-deoxycholate) for 30 minutes on ice. After centrifugation, the cell lysates were subjected to SDS/PAGE and then transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked in TBS-T (Tris-buffered saline supplemented with 0.05% Tween20) with 5% skim milk and probed overnight with gentle shaking using specific antibodies for phospho-STAT5, STAT5, IκBα or Bim (Cell Signaling Technology, Ontario, Canada) or β-actin (Sigma). Membranes were washed 3 times in TBS-T and then incubated with HRP-conjugated anti-rabbit (Sigma, St-Louis, MO) or anti-mouse Ig antibody (Cell Signaling). HRP signals were revealed using the Amersham ECL detection system (GE Healthcare Life Sciences) and the ImageQuant LAS-4000 imager (GE Healthcare Life Sciences) was used for the digital acquisition. Quantification of western blot signals was performed using the Multi Gauge Software (Fujifilm, Tokyo, Japan) and pSTAT5/total STAT5, BimEL/β-actin or IκBα/β-actin ratios were calculated. The statistical analysis for significance was done using a paired Student t-test (n=3 unless otherwise specified).

Results

Corticosterone (CST) induces apoptosis of CD8 memory T cells

GCs have been shown to stimulate apoptosis in different lymphocyte subsets. Since stress factors produced during space missions trigger viral reactivation, the impact of the stress hormone CST on survival of central memory $CD8^+$ T cells was assessed. These cells were generated by exposing splenocytes from OT-I mice to the SIINFEKL peptide followed by culturing with IL-15 (Pulle et al., 2006). The phenotype of central memory CD8 T cells was verified 9 days after stimulation, where these cells expressed high levels of CD62L and CD44, and most of the cells had lost the expression of CD69 (Figure 1A). Addition of CST at physiological concentrations observed in condition of stress (Hermann et al., 1994) triggered high levels of cell death *in vitro*, as shown by changes in cell morphology and the appearance of Annexin-V positive cells (Figure 1B). This response was observed despite the presence of 20 ng/ml of IL-15 in the cultures, a survival factor for central memory CD8 T cells (Osborne and Abraham, 2010). Kinetic experiments showed that cell death occurred between 6 and 24h following the addition of CST (Figure 1C).

IL-15 inhibits apoptosis triggered by CST in CD8 memory cells

Central memory T cells are dependent on survival signals for homeostatic persistence after a successful immune response. Since IL-15 is a major survival factor for this cell subset, the hypothesis that it could antagonize the pro-apoptotic effect of CST was verified. Figure 2 shows that addition of IL-15 to the cultures inhibited CD8 central memory cell death *in vitro* in the presence of CST in a dose-dependent manner. In a preliminary experiment, the protective effect of IL-15 correlated with activation of STAT5 phosphorylation, as soon as 1 h after addition of IL-15 (Figure 3A). This result remains to be confirmed. Although STAT5 phosphorylation levels were slightly higher in the presence of IL-15 and CST, the stress hormone did not seem to have a significant impact on this early event of IL-15 signaling (Figure 3B).

Regulation of NF-κB expression is not involved in the response of memory cells to CST or IL-15

Glucocorticoids have been shown to trigger apoptosis in T lymphocytes by inhibiting NF-κB activity (Auphan et al., 1995). The GCR can affect the function of this transcription factor either by direct interaction or through upregulation of IκBα expression. To investigate the role of this factor in CST-induced apoptosis of memory CD8 cells, the level of IκBα was determined in the presence of CST, IL-15 or both. Results presented in Figure 4 show that in this model, IκBα levels expressed as an IkB/actin ratio were not affected by CST or IL-15 after 1 h or 4 h of stimulation.

Role of Bim in central memory CD8 cell survival in the presence of corticosterone

The GCR induces the expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim in pre-B ALL cell lines (Abrams et al., 2004). Bim inactivation also reduces double positive thymocytes mortality induced in vivo by dexamethasone injection (Erlacher et al., 2005). Therefore the role of Bim in this model of stress-induced apoptosis of memory CD8 cells was assessed through determination of Bim levels in these conditions. Following addition of increasing concentrations of IL-15, in the presence or absence of CST, BimEL levels were analyzed by western blot. Results presented in Figure 5 suggest that there is no significant change in BimEL levels in the presence of CST and that addition of IL-15 does not decrease the level of this pro-apoptotic factor.

IL-15 induces GITR expression on CD8 memory T cells

IL-15 sends a survival signal in central CD8 memory T cells (Becker et al., 2002) and a recent study demonstrated that the glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) plays an important role in this protective effect. IL-15 can up-regulate the expression of GITR in memory CD8 T cells (Snell et al., 2012) and the presence of GITR on memory CD8 T cells is required for their persistence in vivo (Lin et al., 2013). Confirming previous results, we found that IL-15 increased GITR expression in a dose-dependent fashion in our model (Figure 6).

Discussion

Resting memory T cells constantly monitor the entire system to ensure that no foreign threat to the host can be found. This is especially critical in the case of latent viruses such as EBV, CMV or VZV. Some significant events have been shown to trigger viral reactivation. Stressful events including UV exposition, mental examination or intense physical activities have been shown to result in an elevation of viral titers in the blood. In this study, we demonstrated that treatment of resting CD8+ memory T cells with physiological amount of corticosterone corresponding to chronic stress triggers the apoptotic process. This response seems to require transcriptional regulation since cell death is not detectable before 6 h of culture with CST. Addition of IL-15 concurrently with the stress hormone inhibited in a dose-dependent manner the pro-apoptotic effect of CST.

Association of IL-15 to its receptor triggers the recruitment and phosphorylation of molecules of the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 5 (JAK-STAT5) pathway (Johnston et al., 1995; Leonard and O'Shea, 1998). JAK kinase phosphorylates tyrosine residues of the γc and IL-15Rα subunits of the IL-15 receptor, leading to the recruitment and subsequent phosphorylation of the Stat5a/b complex followed by its translocation to the nucleus (Budagian et al., 2006). In Stat5a/Stat5b double knockout mice, there is a significant decrease in hematopoietic stem cells repopulation capacity and a clear lymphopenia (Bunting et al., 2002; Snow et al., 2002). Although thymic development is normal in these mice, Stat5a/b$^{-/-}$ T cells lack the ability to proliferate and migrate to sites of inflammation while NK cells are totally absent . Inversely, constitutive activation of Stat5 significantly enhances the survival of terminally differentiated effector T cells and the consequent formation of memory T cells (Hand et al., 2010). Another mechanism by which IL-15 ensures the survival of memory T cells is the regulation of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-X_L (Berard et al., 2003; Lord et al., 2000). Indeed, the addition of IL-15 to resting CD44^{high}CD8+ T cells induced the expression of Bcl-2 family proteins *in vitro* preventing spontaneous apoptosis. Glucocorticoid signaling inhibits the NF-κB transcription factor by preventing its translocation to the nucleus or increasing the expression of its cytoplasmic inhibitor, the IκBα protein. Our results suggest that CST does not induce apoptosis through this mechanism in CD8 memory T cells. The impact of CST on Bcl2 and

BclXL levels remains to be determined. Glucocorticoids have also been shown to trigger apoptosis of leukemia B cell lines by inducing the expression of the pro-apoptotic protein Bim, however CST did not affect Bim levels in CD8+ memory T cell cultures. We found that the presence of corticosterone and increasing doses of IL-15 had no impact on the protein levels of Bim. These results suggest that glucocorticoid-induced apoptosis of memory CD8 T cells does not involve this Bcl-2 family member.

The glucocorticoid-induced TNF-related (GITR) protein is required for the survival of CD8 memory T cells *in vivo* (Lin et al., 2013). GITR signaling results in NF-κB activation and a consequent upregulation of Bcl-xL expression which is responsible for the increased survival of antigen-specific CD8 T cells (Snell et al., 2010). The expression of this TNFR family member on memory T cells increases in the presence of IL-15 (Snell et al., 2012). In our in vitro model, GITR expression by CD8 memory T cells was also enhanced in the presence of IL-15 in a dose-dependent manner. These results suggest that GITR may be involved in the protection from glucocorticoid-induced apoptosis by IL-15. Ligation of IL-15 with its receptor activates Stat5, which triggers the expression of BCL10, an upstream regulator of NK-κB activity (Nagy et al., 2009). Since IL-15 has been shown to induce NF-κB activation in neutrophils and cerebral endothelial cells, this suggests that IL-15 could also use another anti-apoptotic pathway to promote survival in resting memory T cells (McDonald et al., 1998; Stone et al., 2011).

Our results demonstrate that IL-15 protects against glucocorticoid-induced cell death. Preliminary analysis of the mechanisms by which this effect is possible seems to rule out a role for IκBα and the proapoptotic protein BIM. However, significantly higher level of GITR in the presence of increasing doses of IL-15 shows that GITR could be involved in the anti-apoptotic effect of IL-15. This TNFR family member is essential for the 4-1BB receptor expression on memory CD8 T cells as well as their survival *in vivo* (Lin et al., 2013). GITR is also known to interact with the TNF associated factor (TRAF1, TRAF2 and TRAF3), which downstream signaling leads to enhanced survival of the CD8 memory T cells (Snell et al., 2010). Hence, our results suggest that IL-15 upregulates GITR expression at the T cell surface which, as in RCT-mediated activation, could inhibit corticosterone-induced apoptosis.

Results presented in this study are relevant to chronic viral infection therapy and vaccine development. The anti-apoptotic capacity of IL-15 suggests potential new therapeutic interventions against latent infections that are influenced by stress hormones, such as Herpes infection. Since GITR also enhances the stimulation of effector and regulatory T cells, there is a need to better understand the interaction between the signaling of this TNFR family member and IL-15. In addition, specifically targeting one of these molecules could help shift workers or astronauts better manage the immune consequences of their stress levels.

Literature cited

Abrams MT, Robertson NM, Yoon K, Wickstrom E. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. J Biol Chem 2004;279:55809-55817.

Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. Biochem Pharmacol. England, 2002: 843-850.

Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat Med 2002;8:379-385.

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science 1995;270:286-290.

Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. J Exp Med 2002;195:1541-1548.

Berard M, Brandt K, Bulfone-Paus S, Tough DF. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. J Immunol 2003;170:5018-5026.

Bianchi M, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-2-induced JAK-STAT signaling by glucocorticoids. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:9573-9578.

Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. Cytokine Growth Factor Rev 2006;17:259-280.

Bunting KD, Bradley HL, Hawley TS, Moriggl R, Sorrentino BP, Ihle JN. Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. Blood 2002;99:479-487.

Decman V, Freeman ML, Kinchington PR, Hendricks RL. Immune control of HSV-1 latency. Viral Immunol 2005;18:466-473.

Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, et al. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. Blood 2005;106:4131-4138.

Glaser R, Pearson GR, Bonneau RH, Esterling BA, Atkinson C, Kiecolt-Glaser JK. Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. Health Psychol 1993;12:435-442.

Glaser R. The differential impact of training stress and final examination stress on herpesvirus latency at the United States Military Academy at West Point. Brain Behav Immun 1999;13:240-251.

Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. Science 1994;264:965-968.

Hand TW, Cui W, Jung YW, Sefik E, Joshi NS, Chandele A, et al. Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:16601-16606.

Heidari N, Miller AV, Hicks MA, Marking CB, Harada H. Glucocorticoid-mediated BIM induction and apoptosis are regulated by Runx2 and c-Jun in leukemia cells. Cell Death Dis 2012;3:e349.

Hermann G, Tovar CA, Beck FM, Sheridan JF. Kinetics of glucocorticoid response to restraint stress and/or experimental influenza viral infection in two inbred strains of mice. J Neuroimmunol 1994;49:25-33.

Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. Cell 1994;76:17-27.

Iwata M, Hanaoka S, Sato K. Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. Eur J Immunol 1991;21:643-648.

Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, et al. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:8705-8709.

Kieslinger M, Woldman I, Moriggl R, Hofmann J, Marine JC, Ihle JN, et al. Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. Genes Dev 2000;14:232-244.

Laycock KA, Lee SF, Brady RH, Pepose JS. Characterization of a murine model of recurrent herpes simplex viral keratitis induced by ultraviolet B radiation. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991;32:2741-2746.

Leonard WJ, O'Shea JJ. JAKs and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol 1998;16:293-322.

Lin GH, Snell LM, Wortzman ME, Clouthier DL, Watts TH. GITR-Dependent Regulation of 4-1BB Expression: Implications for T Cell Memory and Anti-4-1BB-Induced Pathology. J Immunol 2013;190:4627-4639.

Liu Z, Yuan X, Luo Y, He Y, Jiang Y, Chen ZK, et al. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. Cytokine 2009;45:141-147.

Lodolce JP, Burkett PR, Koka RM, Boone DL, Ma A. Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. Cytokine Growth Factor Rev 2002;13:429-439.

Lord JD, McIntosh BC, Greenberg PD, Nelson BH. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. J Immunol 2000;164:2533-2541.

McDonald PP, Russo MP, Ferrini S, Cassatella MA. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. Blood 1998;92:4828-4835.

Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. Annu Rev Immunol 2013;31:137-161.

Murosaki S, Inagaki-Ohara K, Kusaka H, Ikeda H, Yoshikai Y. Apoptosis of intestinal intraepithelial lymphocytes induced by exogenous and endogenous glucocorticoids. Microbiol Immunol 1997;41:139-148.

Nagy ZS, LeBaron MJ, Ross JA, Mitra A, Rui H, Kirken RA. STAT5 regulation of BCL10 parallels constitutive NFkappaB activation in lymphoid tumor cells. Mol Cancer 2009;8:67.

Osborne LC, Abraham N. Regulation of memory T cells by gammac cytokines. Cytokine 2010;50:105-113.

Ploner C, Rainer J, Niederegger H, Eduardoff M, Villunger A, Geley S, et al. The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2008;22:370-377.

Pulle G, Vidric M, Watts TH. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. J Immunol 2006;176:2739-2748.

Sabbagh L, Snell LM, Watts TH. TNF family ligands define niches for T cell memory. Trends Immunol. England, 2007: 333-339.

Sawtell NM, Thompson RL. Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. J Virol 1992;66:2150-2156.

Seckert CK, Griessl M, Buttner JK, Scheller S, Simon CO, Kropp KA, et al. Viral latency drives 'memory inflation': a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. Med Microbiol Immunol 2012;201:551-566.

Snell LM, Lin GH, Watts TH. IL-15-dependent upregulation of GITR on CD8 memory phenotype T cells in the bone marrow relative to spleen and lymph node suggests the bone marrow as a site of superior bioavailability of IL-15. J Immunol. United States, 2012: 5915-5923.

Snell LM, McPherson AJ, Lin GH, Sakaguchi S, Pandolfi PP, Riccardi C, et al. CD8 T cell-intrinsic GITR is required for T cell clonal expansion and mouse survival following severe influenza infection. J Immunol. United States, 2010: 7223-7234.

Snow JW, Abraham N, Ma MC, Abbey NW, Herndier B, Goldsmith MA. STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. Blood 2002;99:95-101.

Stone KP, Kastin AJ, Pan W. NFkB is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. Cell Physiol Biochem 2011;28:115-124.

Stowe RP, Kozlova EV, Sams CF, Pierson DL, Walling DM. Latent and lytic Epstein-Barr virus gene expression in the peripheral blood of astronauts. J Med Virol 2011;83:1071-1077.

Suvas S, Kim B, Sarangi PP, Tone M, Waldmann H, Rouse BT. In vivo kinetics of GITR and GITR ligand expression and their functional significance in regulating viral immunopathology. J Virol 2005;79:11935-11942.

Verbist KC, Klonowski KD. Functions of IL-15 in anti-viral immunity: multiplicity and variety. Cytokine 2012;59:467-478.

Zhan Y, Funda DP, Every AL, Fundova P, Purton JF, Liddicoat DR, et al. TCR-mediated activation promotes GITR upregulation in T cells and resistance to glucocorticoid-induced death. Int Immunol 2004;16:1315-1321.

Legends

Figure 1. Corticosterone induces apoptosis in CD8 memory T cells.

T cells were isolated from OT-I mice, stimulated with the SIINFEKL peptide for 18h and differentiated into CD8 memory T cells with 20ng/ml of IL-15 (n=4). (A) Representative FACS plot of the resting central memory CD8 T cells phenotype ($CD62L^{hi}$, $CD69^{low}$, $CD44^{hi}$). (B) CD8 memory T cells (10^6) were incubated with 10^{-6}M of corticosterone or DMSO (CTRL) and 20ng/mL of IL-15 for 24h. Representative cells were surface stained using Annexin V (AnV) and propidium iodide (PI) viability markers analyzed by flow cytometry. (C) Mean percentage of live cells were calculated using AnV-/PI- gated cells. The same viability analysis was performed at 0, 4, 6 and 24hrs. Error bars represent the SEM. *$p<0.01$, n=4.

Figure 2. IL-15 inhibits CST-induced apoptosis in CD8 memory T cells in a dose-dependent manner.

T cells were isolated from OT-I mice, stimulated with the SIINFEKL peptide for 18h and differentiated into CD8 memory T cells with 20ng/ml of IL-15. Resting CD8 memory T cells (10^6) were incubated with 10^{-6}M of corticosterone or DMSO (CTRL) and increasing doses of IL-15 ranging from 0 to 100ng/mL of IL-15. Error bars represent SEM. *$p<0.005$, n=5.

Figure 3. Activation of STAT5 pathway in presence of corticosterone and increasing doses of IL-15.

T cells were isolated from OT-I mice, stimulated with the SIINFEKL peptide for 18h and differentiated into CD8 memory T cells with 20ng/ml of IL-15. (A) Resting CD8 memory T cells (10^6) were incubated with 10^{-6}M of corticosterone or DMSO (CTRL) and increasing doses of IL-15 ranging from 0 to 100ng/mL of IL-15. The levels of pSTAT5 and total STAT5 were determined by Western blot analysis after 1 and 4h. (B) The ratios of pSTAT5/STAT5 levels of 1 experiment are shown at 1h (left) and 4h (right). n=3.

Figure 4. IκBα expression is not affected by the presence of corticosterone or increasing doses of IL-15.

T cells were isolated from OT-I mice, stimulated with the SIINFEKL peptide for 18h and differentiated into CD8 memory T cells with 20ng/ml of IL-15. (A) Resting CD8 memory T cells (10^6) were incubated with 10^{-6}M of corticosterone or DMSO (CTRL) and increasing doses of IL-15 ranging from 0 to 100ng/mL of IL-15. The levels of IκBα were determined by Western blot analysis after 1 and 4h. (B) The ratios of IκBα:actin levels of three independent experiments are shown at 1h (left) and 4h (right). Error bars represent the SEM. n=3.

Figure 5. Expression of BIM_{EL} in central memory CD8 T cells in presence of corticosterone and increasing doses of IL-15.

T cells were isolated from OT-I mice, stimulated with the SIINFEKL peptide for 18h and differentiated into CD8 memory T cells with 20ng/ml of IL-15. (A) Resting CD8 memory T cells (10^6) were incubated with 10^{-6}M of corticosterone or DMSO (CTRL) and increasing doses of IL-15 ranging from 0 to 100ng/mL of IL-15. The levels of BIM_{EL} were determined by Western blot analysis after 1 and 4h. (B) The ratios of IκBα:actin levels of three independent experiments are shown at 1h (left) and 4h (right). Error bars represent the SEM, n=2.

Figure 6. GITR surface expression on CD8 memory T cells is upregulated by IL-15 in a dose-dependent manner.

T cells were isolated from OT-I mice, stimulated with the SIINFEKL peptide for 18h and differentiated into CD8 memory T cells with 20ng/ml of IL-15. Resting central memory T cells were surface stained with anti-GITR antibody and analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) of three independent experiments in presence or absence of increasing dose of IL-15 ranging from 0 to 100ng/mL are illustrated. Error bars represent SEM. n=2.

Figures

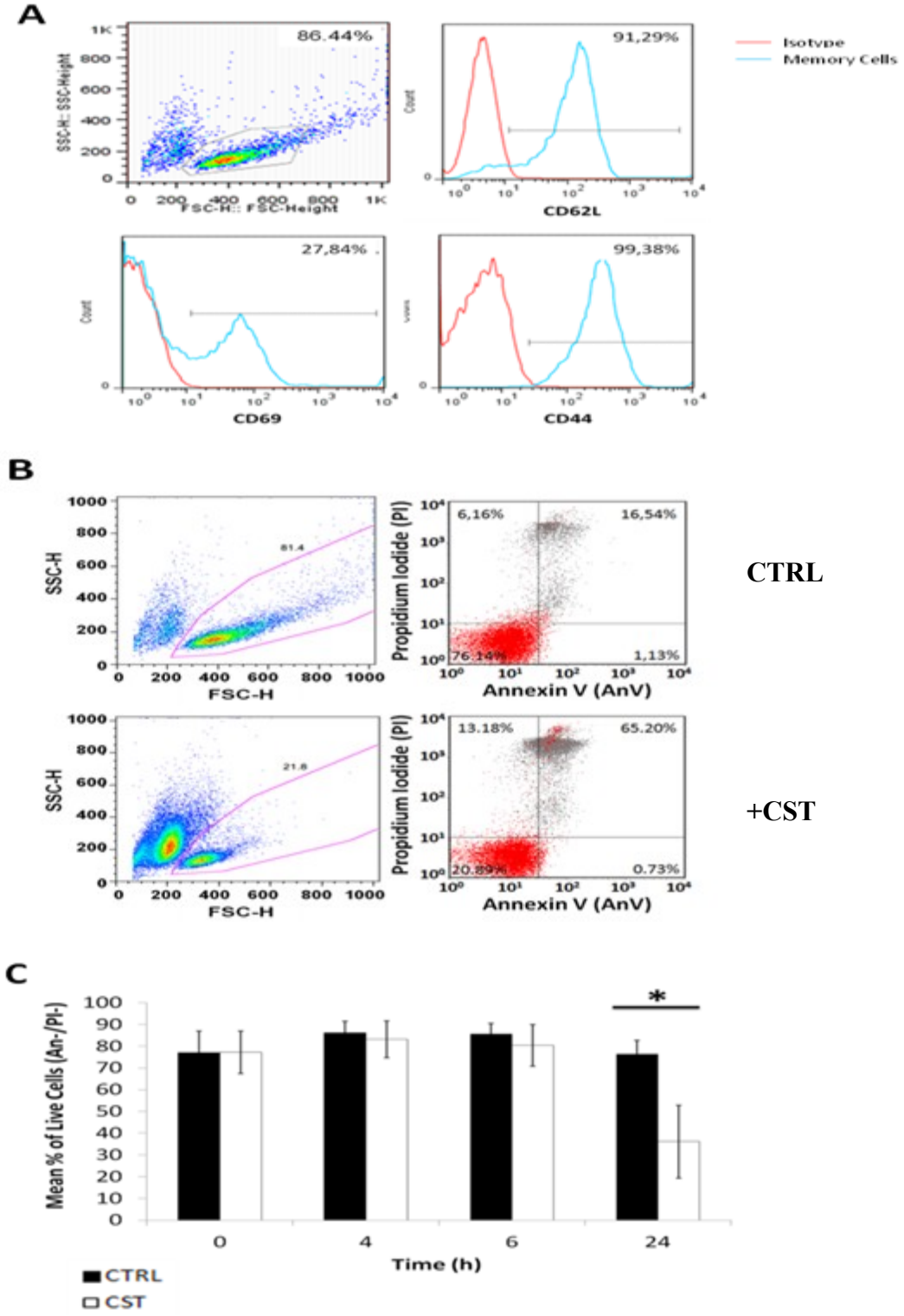


Figure 1 Corticosterone induces apoptosis in CD8 memory T cells.

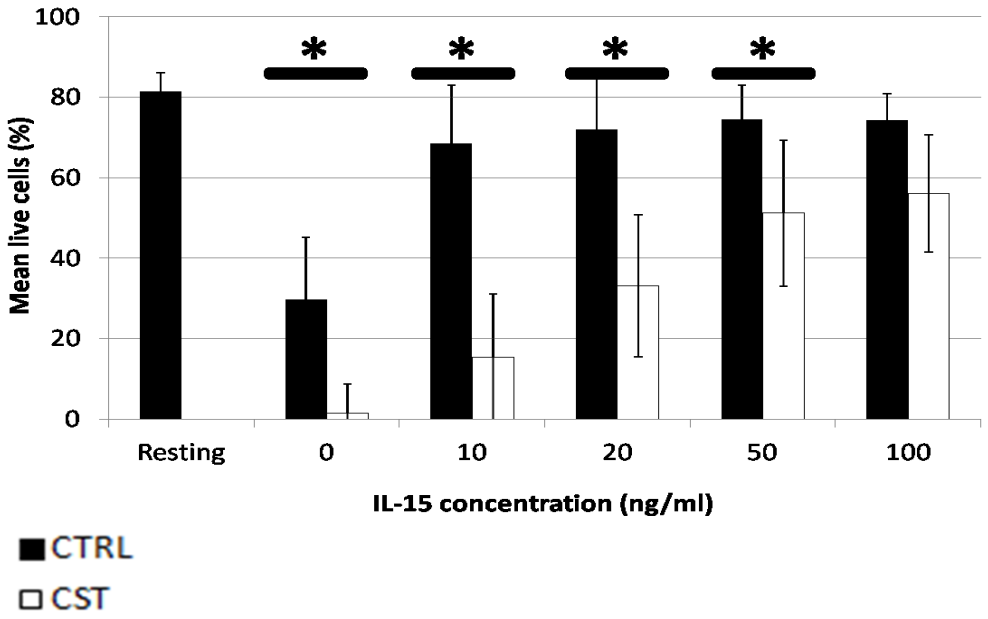


Figure 2 IL-15 inhibits CST-induced apoptosis in CD8 memory T cells in a dose-dependent manner.

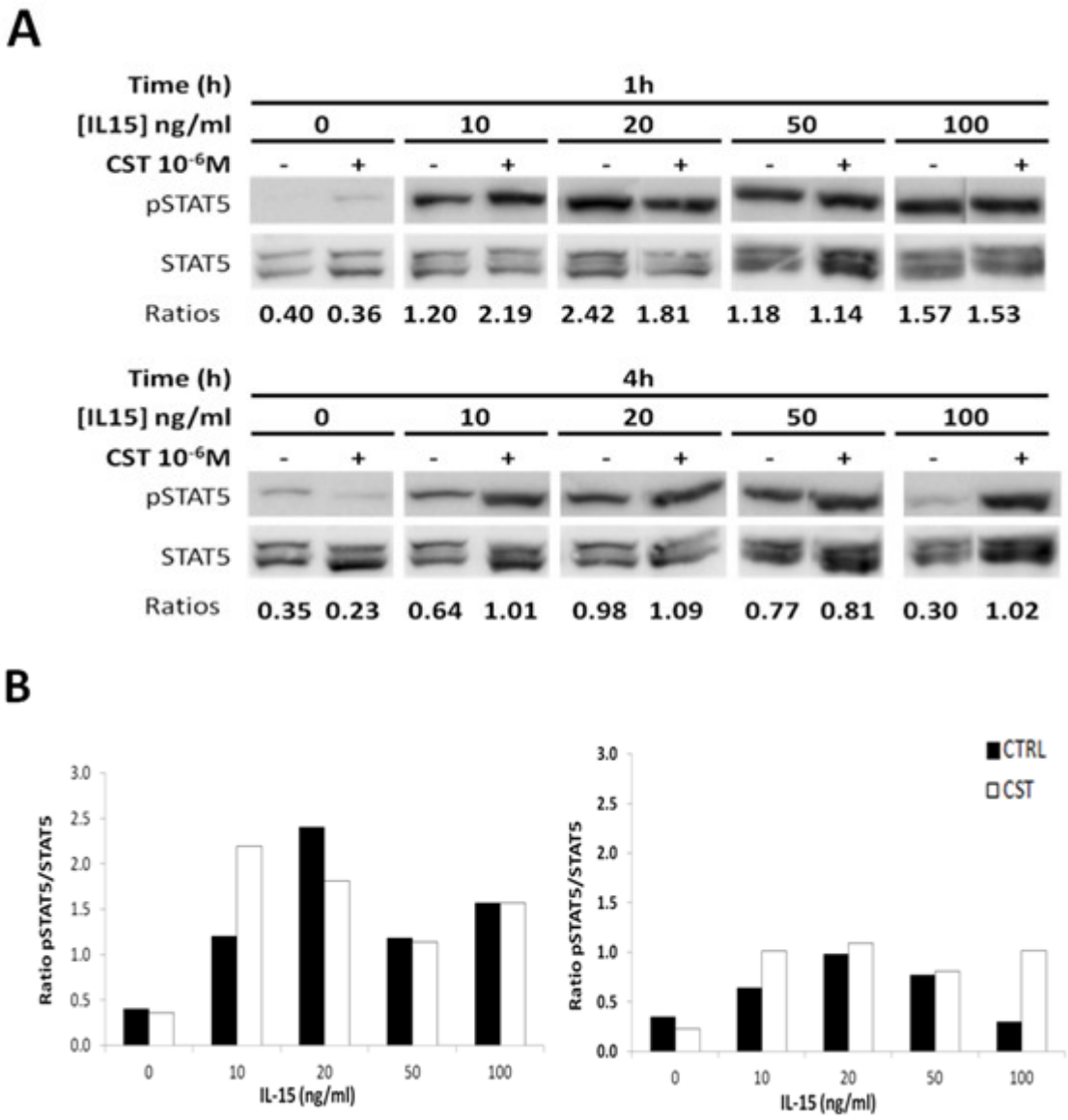


Figure 3 Activation of STAT5 pathway in presence of corticosterone and increasing doses of IL-15.

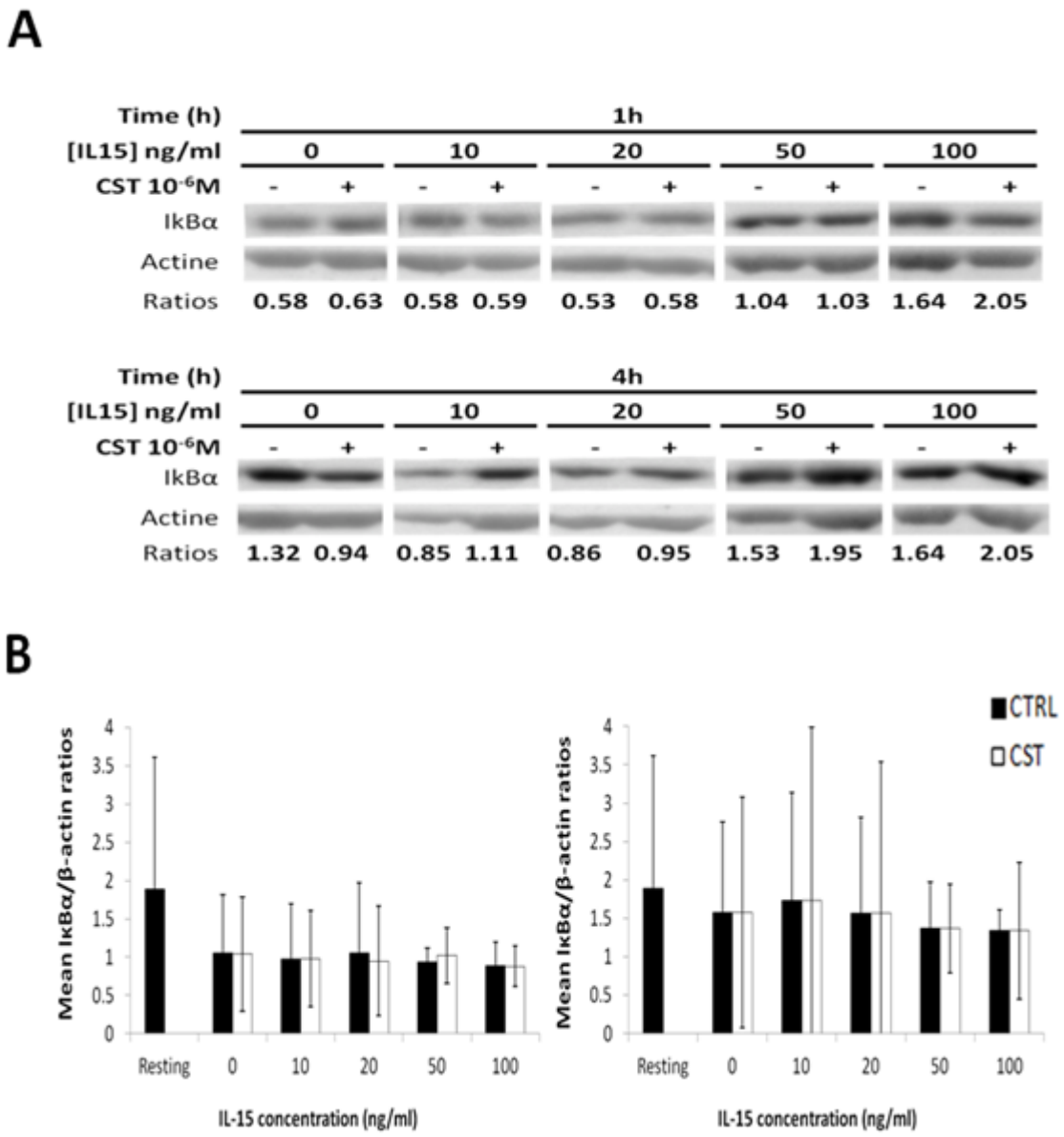


Figure 4 IκBα expression is not affected by the presence of corticosterone or increasing doses of IL-15.

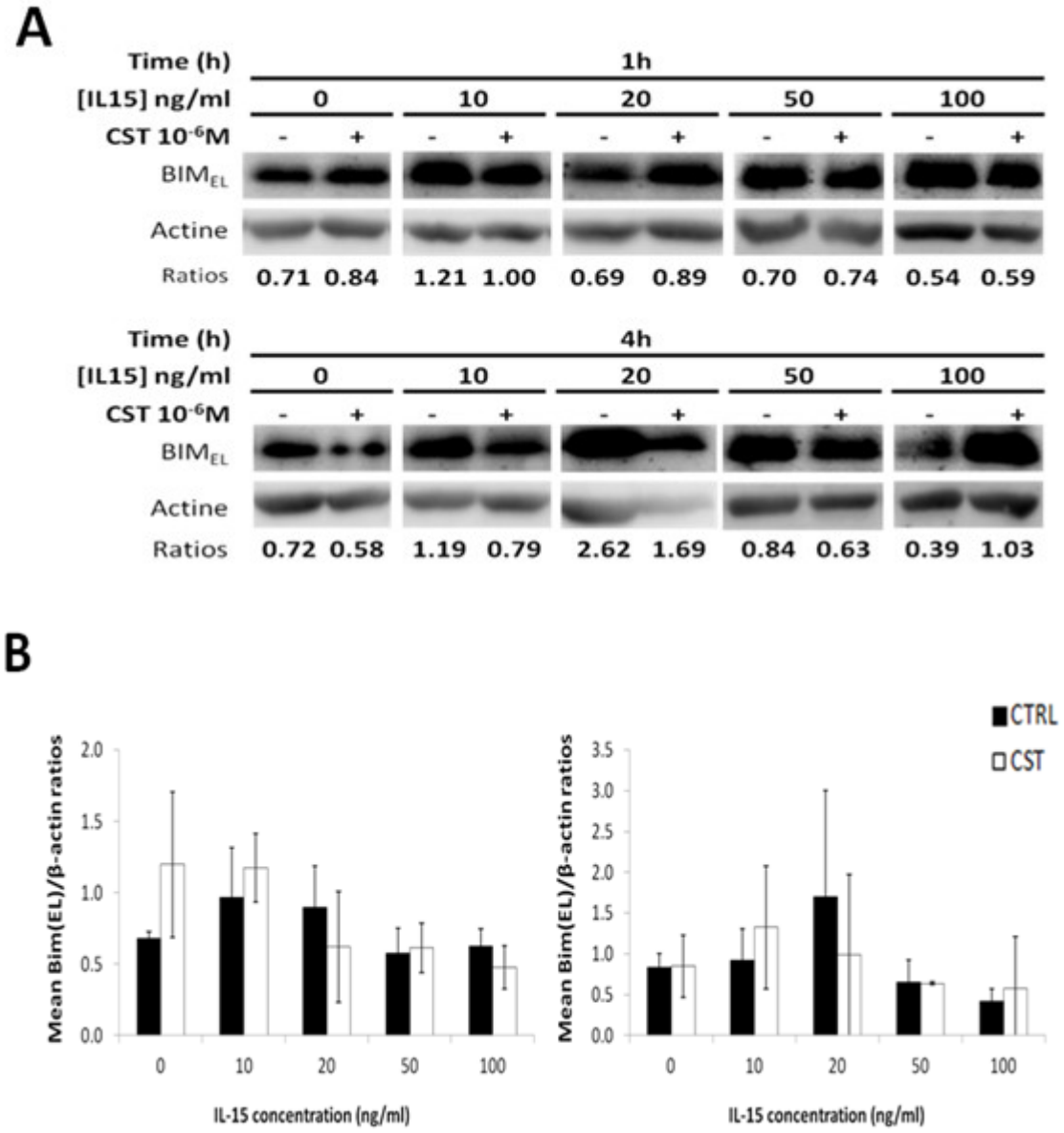


Figure 5 Expression of BIM_{EL} in central memory CD8 T cells in presence of corticosterone and increasing doses of IL-15.

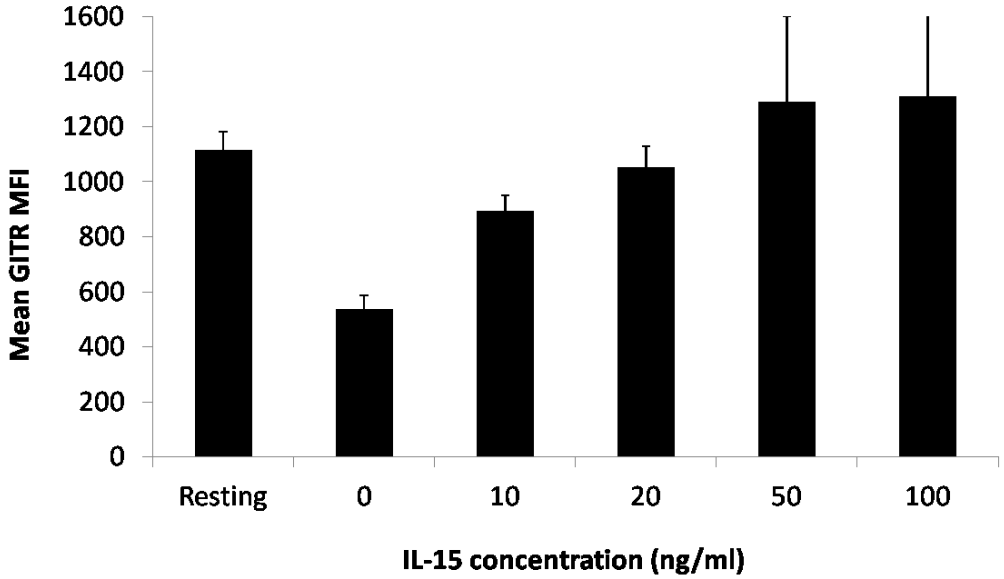


Figure 6 GITR surface expression on CD8 memory T cells is upregulated by IL-15 in a dose-dependent manner.

Article scientifique 2

Résumé

Une plateforme de cytométrie en flux basée sur la fibre optique a été conçue afin de créer un instrument protable et robuste compatible avec les applications spatiales. Au cœur de la technologie de Microflow1 se trouve une chambre fluidique unique couplée à de la fibre optique. Une unité de test du Microflow1 a d'abord été testée et comparée à un cytomètre de flux commercial comme référence dans un environnement de laboratoire standard. Des essais en vols paraboliques ont aussi été effectués afin d'établir la performance du Microflow1 en apesanteur avant d'utiliser la plateforme dans la Station Spatiale Internationale. Le nouveau cytomètre a présenté des performances comparables à ceux des systèmes commerciaux et son fonctionnement en microgravité a été validé. Microflow1 a réussi à performer des tests d'immunophénotypage ainsi que des tests de quantification de cytokines à l'aide de microbilles dans l'environnement spatial et indépendamment des changements de gravité. Les résultats présentés ici démontrent que cette plateforme de cytométrie en flux basée sur la fibre optique est compatible avec l'environnement spatial sans compromis importants pour la performance analytique de l'appareil.

ORIGINAL ARTICLE

Cytometry PART A
Journal of the International Society for Advancement of Cytometry

MIFlowCyt

Microflow1, A Sheathless Fiber-Optic Flow Cytometry Biomedical Platform: Demonstration Onboard the International Space Station

Geneviève Dubeau-Laramée,[1] Christophe Rivière,[2] Isabelle Jean,[1] Ozzy Mermut,[2] Luchino Y. Cohen[1*]

[1]Canadian Space Agency, St-Hubert, Quebec, Canada

[2]Institut National d'Optique, Quebec City, Quebec, Canada

Received 8 August 2013;
Revised 8 November 2013;
Accepted 26 November 2013

*Correspondence to. Luchino Y. Cohen, 6767 Route de l'Aéroport, Saint-Hubert, Quebec, Canada J3Y 8Y9.

Published online 00 Month 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22427

Published by Wiley-Periodicals, Inc.
© 2013 Government of Canada

• **Abstract**

A fiber-optic based flow cytometry platform was designed to build a portable and robust instrument for space applications. At the core of the Microflow1 is a unique fiber-optic flow cell fitted to a fluidic system and fiber coupled to the source and detection channels. A Microflow1 engineering unit was first tested and benchmarked against a commercial flow cytometer as a reference in a standard laboratory environment. Testing in parabolic flight campaigns was performed to establish Microflow1's performance in weightlessness, before operating the new platform on the International Space Station. Microflow1 had comparable performances to commercial systems, and operated remarkably and robustly in weightlessness (microgravity). Microflow1 supported immunophenotyping as well as microbead-based multiplexed cytokine assays in the space environment and independently of gravity levels. Results presented here provide evidence that this fiber-optic cytometer technology is inherently compatible with the space environment with negligible compromise to analytical performance. Published by Wiley-Periodicals, Inc. © 2013 Government of Canada

• **Key terms**

flow cytometry; biomedical diagnostics; sheathless; space flight; microgravity; immunophenotyping; multiplex assays; fiber-optics; microfluidics; International Space Station

ADVANCES in flow cytometry have mostly increased the complexity of flow cytometers and requirement for training, in parallel with improvements on performance. While there are trends in miniaturization and portability, the development of microfluidic flow cytometers is still at an early stage (1–5) and these instruments are just emerging to the market as potential commercial technologies. Although commercial small systems such as the Guava easyCyte (EMD Millipore), Cyflow Cube 6 (Partec), or Accuri C6 (Becton Dickinson) now exist, they are still mostly used in a laboratory environment by trained personnel. The core of flow cytometry instrumentation, the interrogation flow cell, must be made simple yet robust and the requirement for regular optics alignment must be removed if the instrument has to be mobile. The fluidic system must focus cells or particles in a single file into the interrogation zone without bulky and heavy systems producing large volumes of biological waste. The instrument must be able to withstand shocks, vibrations, and other environmental challenges. Energy consumption, size, mass, and heat produced are other factors in the way of portability, especially in the context of space flight.

Given their versatility, flow cytometers would be very useful biomedical instruments in isolated, extreme and unconventional environments such as under water or

ISAC
International Society for Advancement of Cytometry

space habitats. Several decades of human space flight have demonstrated that adaptation to weightlessness (microgravity) is responsible for many physiological changes such as bone loss and muscle degradation, cardiovascular adaptation, and defects in immune function (reviewed in (6)). Alteration of immune functions reported are mostly related to the distribution of leukocytes, cytokine levels, and impaired function of lymphocytes, natural killers, neutrophils and monocytes (7–11). These changes are the most probable cause of reactivation of latent virus observed after short as well as long duration space missions (12–14). A flow cytometry platform onboard the International Space Station (ISS) would be a tremendous asset to better understand this physiological adaptation and support medical monitoring of astronauts.

For the purpose of creating a portable flow cytometer, a custom and unique optic fiber-based flow cell was conceived and developed. Specially designed fiber optofluidics were used to propagate excitation light, provide an interrogation zone for passing samples, collect fluorescence emission or side-scattered light and even focus the biological sample within the light path. This innovative fiber-optic flow cell (FOFC) is at the heart of Microflow1. The instrument was first compared to a commercial cytometer in laboratory, and then tested in reduced gravity during parabolic flights. A flight unit was operated on the ISS, using samples prepared on the ground. Details of instrument design and environmental test results are the subject of subsequent publication. The performance of Microflow1 utilizing both microbead-based multiplexed cytokine quantification and immunophenotyping is presented here.

Materials and Methods

Microflow Design

Microflow1 (Fig. 1A) is a standalone, battery operated, sheathless microflow cytometer. It is compact (34 cm W × 19 cm D × 20 cm H) and includes a closed fluidic system with three levels of containment at all time to comply with safety requirements for the ISS. The system comprises the analytical instrument and a six-sample plug and play cartridge. The interrogation volume is enclosed in an FOFC (Fig. 1B) prepared by transversally boring a hole through the excitation fiber, via laser micromachining and etching processes. A capillary is inserted into the bored hole for sample introduction to the laser probing volume. The square capillary is firstly drawn out to create a taper with a 1/3 reduction factor. The thinner part is inserted into the hole of the rectangular silica excitation fiber. The interstice between the capillary and the walls of the fiber is filled with zero auto-fluorescence index matching oil. Two 100-µm core multimode fibers are positioned perpendicularly to the capillary and the excitation fiber, on each side of this fiber, to collect the side-scattered and the fluorescence lights. Both collection fibers are bundled together for mating to the detection part through a sole optical connector. Microflow1 is equipped with a 488 nm laser diode excitation source (50 mW Fibertec II from Blue Sky Research, Milpitas, CA, USA), a fiberized collection system for phycoerythrin (PE)

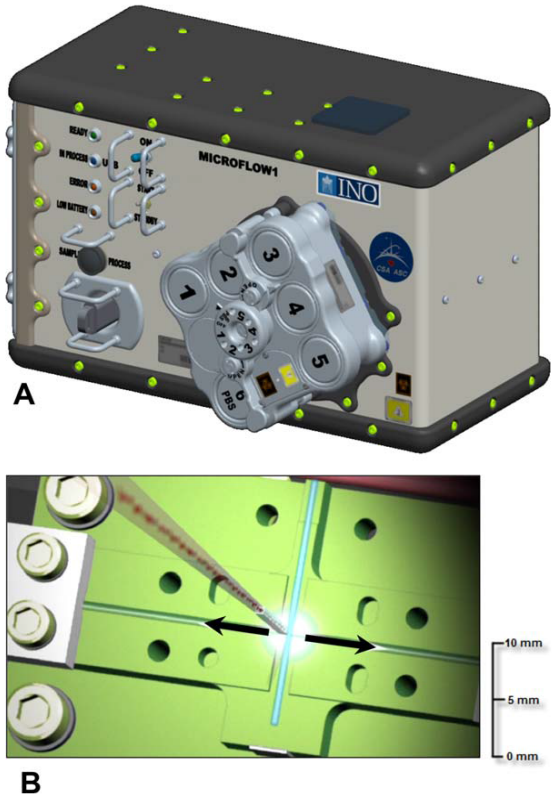


Figure 1. Microflow1 instrument and concept of fiber-optic flow cell. (**A**) Design of the Microflow1 flight unit model with the attached cartridge in front. (**B**) Representation of the fiber-optic flow cell (FOFC). The fiber core carrying the sample perpendicularly enters the interrogation space within the optic fiber conducting the excitation light. The black arrows represent the emitted fluorescence captured by collecting optic fibers. The capillary and red cells are not drawn to scale.

(575/10 nm bandpass filter from Semrock, Rochester, NY, USA), PE-Cy5 (670/30 nm bandpass filter, Semrock) and side scatter channel (SSC) (488/10 nm bandpass filter, Semrock). The analyte is advanced by syringe into a calibrated loop assuring volumetric analysis capacity. A pump (Turbisc from CSEM, Alpnach-Dorf, Switzerland) connected to a rinse bag (PBS) is used to push the sample through the loop to the FOFC for acquisition. An electromechanical three-way valve (Bio-Chem Fluidics, Boonton, NJ, USA) in the circuitry enables the flushing of the sample excess at the injection and when washing with the PBS rinse solution. Fluidics are designed within a three levels of containment enclosure for astronaut and equipment safety as well as for separation of the electronics from any possible fluid contact. The data processing is managed by a Windows CE-based electronic board driven to generate raw or FCS files.

Instrument Performance Assessment

The calibration bead method employed here was based on the technique developed by Chase and Hoffman (15) as a mean to measure fluorescence sensitivity in cytometry based

on background (B) and detection efficiency (Q). A multiparametric characterization approach was achieved by preparing a mixture of beads as a cocktail. The B and Q rapid method was modified by using the instrument noise instead of background from blank beads. Measurements in laboratory were used as the baseline for relative comparison of Microflow1 performances in altered gravity levels. The coefficient of variation (CV) of the PE channel was measured with Orange Linear Flow 100% brightest population (OLF 100, 2.5 μm, 7.1E+04 beads/ml from Molecular Probes, Life Technologies, Burlington, ON, Canada). This bead population was also used to correct the CV of the other bead populations. The MESF-calibrated bead population RCP-P4 (11 μm, 7.4E+04 beads/ml, from Spherotech, Lake Forest, IL, USA) was used as the MESF calibrator for the fluorescence intensities of the other beads. Calculation of the background (B) and detection efficiency (Q) was performed using the OLF 0.1% quasi-medium bright bead population (OLF0.1, 2.5 μm, 7.1E+04 beads/ml, Molecular Probes) and the instrument background. Bright Carmine Linear Flow 100% brightest beads (CLF100, 6 μm, 7.4E+04 beads/ml, Molecular Probes) were also added to simultaneously assess the CV in the PE-Cy5 channel. Beads with different sizes facilitated the discrimination of populations by plotting SSC data versus PE channel intensities. All beads were mixed in PBS containing 5% BSA to reduce adherence or aggregation (16).

Human Th1/Th2 Multiplexed Assay

To minimize sample number and manipulations during the technology demonstration in orbit, the standard CBA assay was modified as follows. The Human Th1/Th2 CBA kit (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) was used with a modified protocol to produce four cytokine standard curves in a single sample. A mix of four cytokine capture beads was prepared in assay diluent. Serial dilutions of cytokine standards were also prepared in assay diluent. The same volume of each standard dilution (5000 pg/ml, 1250 pg/ml, 156 pg/ml, and 20 pg/ml), cytokine capture bead mix, and PE-detection reagent was separately incubated for 1 h in the dark at room temperature. Beads were subsequently washed with wash buffer, suspended in 500 μl of filter-sterilized PBS containing 1% paraformaldehyde (PFA, VWR International, Ville Mont-Royal, Quebec, Canada) and incubated overnight at 4°C. Each sample was centrifuged, suspended in filter-sterilized PBS (or in PBS containing 1.25% Bovine Serum Albumin (Sigma–Aldrich, Oakville, ON, Canada) for the space flight samples) and then pooled in the same tube to obtain a unique sample containing 16 bead populations, corresponding to 4 dilutions for the 4 cytokines. Depending on the biological sample used, the cytokine capture beads used were specific to IL-2, IL-4, IL-5, and IL-10, or to IL-2, IL-4, TNFα, and IFNγ. Biological samples were prepared using blood obtained from healthy volunteers, following their written informed consent validated by the institutional review board of Maisonneuve-Rosemont Research Center (Montreal, Canada). Supernatants from mixed human lymphocyte reactions (MLR) were produced by Dr. Denis-Claude Roy (Maisonneuve-Rosemont Research Center) and tested according to the standard Human Th1/Th2 CBA kit instructions. Once cytokine concentrations were established for a specific MLR supernatant, the same volume of supernatant, capture bead mix specific to four cytokines and PE-detection reagent were mixed and the beads were treated as described above for the standard. To calculate cytokine concentrations using mean fluorescence intensity (MFI) values of CBA populations, a second-order univariate polynomial equation was obtained from PE fluorescence (MFI_{PE}) versus cytokine standard concentration ([Cyt]) data, where A, B, and C are constants:

$$MFI_{PE} = A[Cyt]^2 + B[Cyt] + C$$

Then, knowing the measured MFI in the PE channel of the MLR cytokines ($MFI_{PE,MLR}$) the fitted polynomials were used to derive the concentrations of these cytokines, $[Cyt_{MLR}]$ using the quadratic formula below. In case of negative concentration, the value was adjusted to 1.

$$[Cyt]_{MLR} = \frac{-B + \sqrt{\left(B^2 - 4A * \left(C - MFI_{PE,MLR}\right)\right)}}{2A}$$

Immunophenotyping

Human stabilized whole blood control for lymphocyte subset enumeration (Multi-Check Control, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) was directly stained with PE-conjugated anti-human CD4 antibody (BD Pharmigen, Mississauga, ON, Canada; clone RPA-T4; used at 1:50 dilution) and PE-Cy5-conjugated anti-human CD45 antibody (BD Pharmigen, clone TU116; used at 1:50 dilution) for 15 min at 4°C. FACS Lysing Solution (BD Biosciences) for parabolic flights and Cylyse solution (Partec, Swedesboro, NJ, USA) for the ISS technology demonstration were used to lyse red blood cells according to manufacturer's instructions and leukocytes were suspended in PBS containing 1% paraformaldehyde. After an overnight incubation at 4°C, leukocytes were washed and suspended in PBS (or PBS containing 1.25% of BSA for flight samples) prior to analysis by flow cytometry.

Assay Protocols and Data Analysis on the Ground

A custom FACS Array cytometer (BD Biosciences) was used as the ground reference cytometer. It was equipped with two lasers (solid state lasers 488 nm and 635 nm) and band-pass filters for light emission were 530/30 and 585/42, 661/16 and 780/60nm. A volume of 100 μl for each sample was analyzed using the FACS Array System software. A minimum of 10,000 cells, 1000 calibration beads, or 200 CBA beads (for each population) were collected during analysis using a flow rate of 1 μl/s. Samples were injected into the Microflow1 cytometer either via 1-ml luer slip syringes (0.5 ml sample volume) or via a six-chamber cartridge (1.6 ml sample volume each). In both cases, about 40 μl of sample was processed. Flow rate during data collection was 0.83 μl/s and the data was analyzed using custom software with FCS file generation capability. The FCS Express 4 Flow Research Edition software

(De Novo Software, Los Angeles, CA, USA, version 4.03.001) was used to analyze the data obtained with both platforms. To compensate for the spectral spillover of the PE dye in the PE-Cy5 fluorescence channel, color compensation was applied on CBA data in order to equalize the PE-Cy5 MFI of the four TNF sub-populations. For immunophenotyping, color compensation was used in order to match the PE MFI of granulocytes with the one of $CD4^-$ lymphocytes and the PE-Cy5 MFI of $CD4^+$ and $CD4^-$ lymphocytes. For the blood samples, a gate including all $CD45^+$ white blood cells (WBC) was created on an SSC versus CD45 scatter plot. Based on this gate, a CD45 versus CD4 plot was used to identify granulocytes, monocytes, and CD4-positive and CD4-negative lymphocytes. For statistical analysis, the Student's *t*-test was used and a difference was confirmed by a value of $P < 0.05$.

Assay Protocols for Parabolic Flights

Parabolic flights were conducted at the Canadian National Research Council (CNRC) Flight Research Laboratory (FRL, Ottawa, ON, Canada) using a Falcon-20 jet, which performs repeated parabola-shaped flight patterns. During parabola initiation and recovery, the acceleration of the plane measured on board is around 2*g* along the *z*-axis during approximately 20 s. Between these two 2*g* periods, the plane enables 0*g* (reduced gravity) periods lasting around 20 s. An experiment was considered to be at 0*g* when the absolute *z*-axis acceleration value was below 0.2*g*. Samples were preloaded in the sample cartridge before the onset of the flight and kept in cold until analysis. A Microflow1 instrument engineering model was fixed in the passenger cabin and operated in level flight (1*g*) or during parabolas (sequence of 2*g* and 0*g* periods). The total duration of data acquisition with Microflow1 was 60 s, approximately the duration of one parabola from the 2*g* pull up until the descending 2*g*. Timestamps were used and synchronized with Microflow1's time clock, starting at the beginning of the 2*g* cycle, and at the onset of 0*g* period during a parabola. Using the synchronized timestamps, it was possible to identify the portion of data acquired exclusively during the 0*g* period of the parabola, which was extracted to generate FCS files and analyzed as described above. The number of events collected in these short (20 s) periods is three times lower than analogous data collected in 1*g* (60 s).

Assay Protocols on the ISS

In order to test Microflow1 performance in orbit, two space qualified flight units were used to analyze the same samples on the ground and on the ISS. The samples were prepared and fixed in the Canadian Space Agency (CSA) laboratory 10 days prior to launch, as previously described. Integrity of the fixed samples was previously confirmed over a period of 8 weeks at 4°C (data not shown). Samples were shipped to NASA Kennedy Space Centre in Cape Canaveral, Florida and loaded into four cartridges 3 days before the launch of the SpaceX-2 vehicle (March 1, 2013). One unit was launched with two sample cartridges on board the SpaceX-2 Dragon capsule. Two separate analyses were performed in orbit on March 6 and March 11, with two identical cartridges. Following each analysis, data was recorded on an ISS USB thumbdrive and transferred by telemetry to Earth. Ground control cartridges containing the same samples were analyzed with the second Microflow1 unit in INO's laboratory two days after the on-orbit sessions, to be able to reproduce any unexpected event in orbit. Samples were always stored in cold (around 4°C) from preparation to analysis on the ISS.

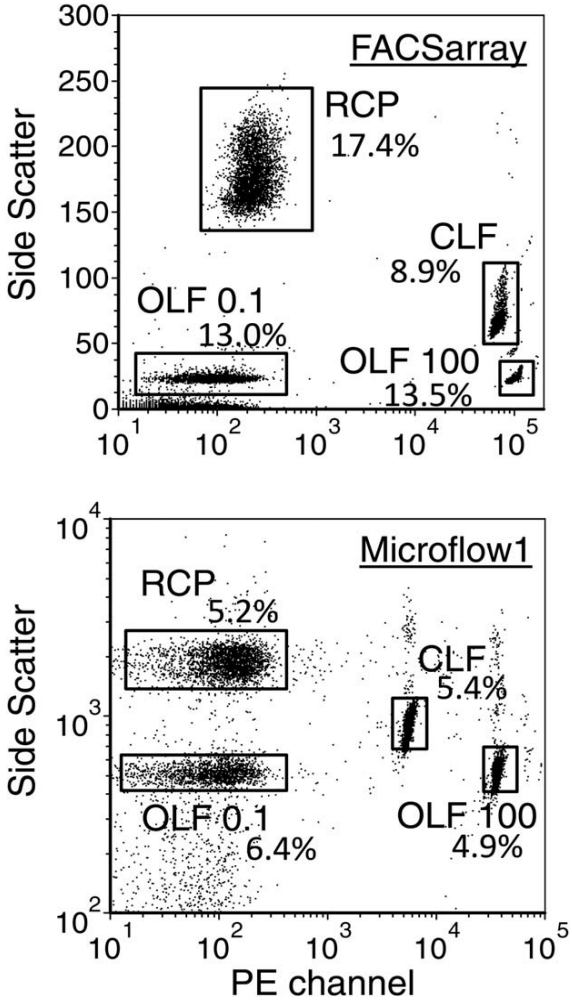


Figure 2. Benchmarking of Microflow1 with calibration beads. Side scatter versus PE channel scatter plots obtained with a fluorescent bead mix composed of Orange Linear Flow beads (OLF 0.1 and OLF 100), Carmin Linear Flow beads (CLF) and Rainbow Calibration Particles (RCP). Upper scatter plot was obtained with the FACS Array and lower plot with the Microflow1, both in a normal laboratory environment. The percentage of events in each gate is indicated in the dot plots.

Results

Performance in Normal Gravity

Microflow1 instrument performance was evaluated using a specific mix of calibration beads analyzed with the FACS Array bench top flow cytometer or the Microflow1 instrument. Scatter plots using the PE and side scatter (SSC)

Table 1. Performance of Microflow1 under different gravity levels.

INSTRUMENT	CONDITION	CV_{PE} (%)	CV_{PECY5} (%)	B_{PE} (MESF)	Q_{PE} (PHOTOE-/MESF)
FACS Array	Ground	3.5 ± 0.6	4.2 ± 0.3	N/A	N/A
Microflow1	Ground	4.7 ± 0.1	4.5[a]	144 ± 133	0.03 ± 0.03
	Parabolic flight 0*g*	4.5 ± 0.3	4.3 ± 0.5	219 ± 13	0.04 ± 0.01
	ISS Ground control	3.9 ± 0.2[b]	4.7 ± 0.4[b]	462 ± 69[b]	0.03 ± 0.02[b]
	ISS 0*g*	4.3 ± 0.4[b]	4.7 ± 0.6[b]	438 ± 47[b]	0.04 ± 0.02[b]

Coefficient of variation (CV) of specific bead populations, background noise (B) and detection efficiency (Q) were calculated for Microflow1 based on the rapid B and Q method. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) of three measurements unless specified. MESF: molecules of equivalent soluble fluorochrome; photoe-: photo-electrons

[a] $n = 1$.

[b] $n = 2$.

channels of the same bead suspension are shown in Figure 2. Light collected in the SSC channel using Microflow1 covers a wider range and is plotted in a logarithmic scale. Microflow1 was equally able to discriminate different beads relatively to their size, when compared to the FACS Array. Microflow1 showed a low background in the SSC, which was well separated from the target bead populations in the mixture. Performance of the Microflow1 unit and the FACS array on the ground are presented in Table 1. The modified *B* and *Q* method could not be applied to FACS Array since the instrument response function was unknown. The CV of the OLF 100 (PE) population was statistically higher with Microflow1 compared to FACS Array ($P < 0.05$). A baseline for the background (144 ± 133 MESF) and efficiency of detection (0.03 ± 0.03 photoe-/MESF) was established in normal laboratory condition.

A human Th1/Th2 cytokine multiplexed microbead-based assay was then analyzed using Microflow1 and the FACS Array to determine the capability of the instrument to detect and quantify soluble molecules in a liquid sample.

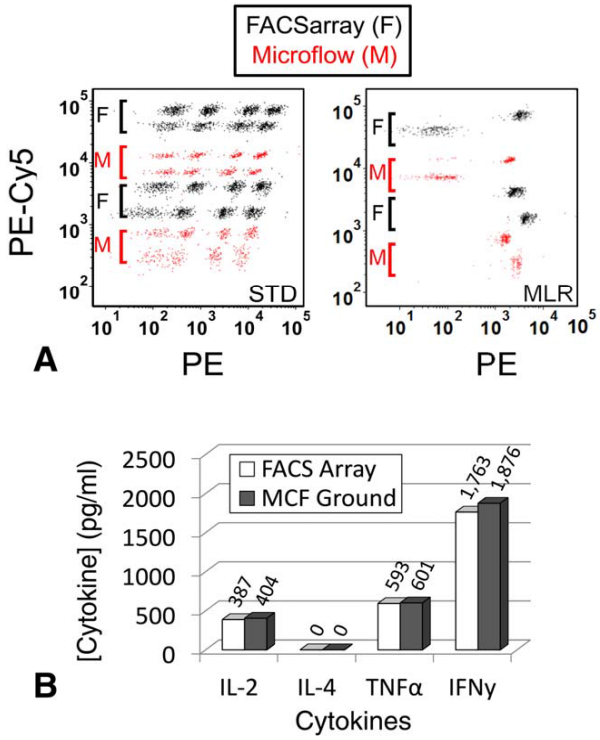


Figure 3. Analysis of a multiplexed Cytometric Bead Assay (CBA). (**A**) PE-Cy5/PE scatter plots showing the distribution of the 16 bead populations in the standard sample (STD) or 4 populations in the biological sample (MLR). Overlays of results obtained with the FACS Array (F, in black) and Microflow1 (M, in red) are shown using the same scale. Fluorescence in the PE-Cy5 channel enables discriminating each capture bead type (from the top: IL-2, IL-4, TNFα and IFNγ). MFI in the PE channel correlates with the standard dilution to which each capture bead was independently exposed (from left: 20, 156, 1250 and 5000 pg/ml). PE-Cy5/PE scatter plot of the biological sample (MLR) shows four capture bead sub-populations (from the top: IL-2, IL-4, TNFα and IFNγ) obtained with the FACS Array (F) or Microflow1 (M). (**B**) Cytokine concentrations in the MLR sample calculated from data obtained with the FACS Array (□) or the Microflow1 (MCF) (■) instruments.

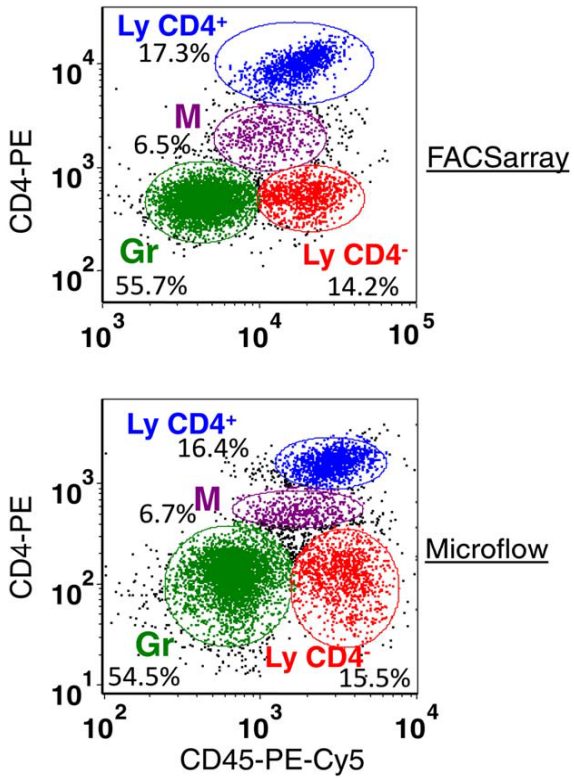


Figure 4. Discrimination of white blood cells (WBC) by Microflow1. Immunophenotyping was performed using anti-CD45-PECy5 and anti-CD4-PE staining for the discrimination of WBC in whole blood. Analysis with the FACS Array (top) and Microflow1 (bottom) instruments was performed in a normal laboratory environment. Gated WBC based on Side Scattering and CD45 expression were then plotted on CD4-PE and CD45-PE-Cy5 to enable discrimination of granulocytes (Gr), $CD4^+/CD4^-$ lymphocytes (Ly) and monocytes (M).

Figure 3A shows an overlay of all CBA populations mixed in the standard (STD) sample (left) or the MLR sample (right) analyzed either with the FACS Array (black), or the Microflow1 unit (red) after applying compensations in the case of Microflow1. The 16 populations in the STD sample were equally well separated after analysis by both instruments. The difference in MFI (PE channel) between the FACS Array and the Microflow1 data was below 1.9% when the MFI of all populations were normalized with respect to the one of beads exposed to the highest cytokine concentration (data not shown). Similarly, the four populations in the MLR sample were clearly identified after analysis with both instruments (Fig. 3A). Benchmarking Microflow1 to FACS Array showed very similar concentrations (Fig. 3B) with a difference of 4.4% (IL-2), 1.3% (TNF), and 6.4% (IFN), which correspond to intra-assay variability (from 2% to 6%) as indicated in the CBA kit instructions. The absence of IL-4 in the sample was confirmed by using the standard CBA assay (data not shown) before performing the analysis with the modified protocol, demonstrating that Microflow1 analysis did not generated false positives. Despite the dispersion of IFNγ capture beads when analyzed with Microflow1 (Fig. 3A), the instrument provided an accurate IFNγ concentration of 1876 pg/ml compared to 1763 pg/ml obtained with the FACS Array.

To determine whether the new technology could differentiate leukocyte sub-populations, human blood cells stained for CD4 and CD45 expression were analyzed with Microflow1. Two CD4/CD45 scatter plots (Fig. 4) gated on CD45 positive cells to eliminate cell debris and instrument noise show that Microflow1 analysis enabled to discriminate granulocytes (green), monocytes (purple), $CD4^+$ lymphocytes (blue), and $CD4^-$ lymphocytes (red) in a blood sample, as well as the reference FACS Array. All leukocyte populations were clearly separated and as shown in Table 2, analysis of FACS Array and Microflow1 data produced similar cell percentages. Overall, results obtained in the laboratory with Microflow1 demonstrated that the FOFC performed well as a sheathless configuration and that this new technology provided results comparable to a traditional free space optics flow cytometer.

Performance in Microgravity During Parabolic Flights

Microflow1 function and operation was tested in microgravity during parabolic flight campaigns. The acceleration pattern of the Falcon-20 jet is presented in Fig. 5A. By synchronizing cytometric data analysis with the accelerometers, data collected only during microgravity was extracted for comparison to the one recorded in normal gravity with the same unit and sample. Table 1 shows the measured performance in the aircraft during data acquired in 0*g*. There was no significant difference ($P > 0.05$) between the CV_{PE}, *B*, or *Q* calculated from data obtained in 1*g* or in 0*g*, suggesting that

Table 2. Comparison of white blood cell percentages measured with FACS Array and Microflow1 in normal and microgravity.

	LABORATORY		PARABOLIC FLIGHT		ISS		
	FA ($N-2$)	MCF ($N-2$)	MCF 1G ($N-3$)	MCF 0G ($N-5$)	FA GC ($N-3$)	MCF GC ($N-2$)	MCF ISS ($N-2$)
Granulocytes	56.6 ± 0.8	53.3 ± 1.6	47.3 ± 3.8	52.3 ± 2.2	48.6 ± 2.9	41.7 ± 3.5	44.0 ± 2.6
Monocytes	7.8 ± 0.3	8.9 ± 1.2	7.5 ± 0.8	6.4 ± 0.9	7.9 ± 0.2	14.5 ± 1.1	9.8 ± 1.1
$CD4^-$ lymphocytes	15.5 ± 1.4	14.5 ± 3.1	14.9 ± 2.5[a]	20.0 ± 2.1[a]	17.0 ± 0.2	14.6 ± 2.4	16.8 ± 1.8
$CD4^+$ lymphocytes	16.9 ± 0.4	16.5 ± 1.1	19.5 ± 0.7[a]	10.9 ± 0.6[a]	14.4 ± 1.1	15.8 ± 2.7	18.3 ± 1.6

Results were obtained with different batches of Multicheck controls for each condition (laboratory, parabolic flight and ISS). At least two independent measurements were performed (as indicated) and the mean ± SD is presented. FA: FACS Array; MCF: Microflow1; GC: Ground Control; ISS: International Space Station

[a]Significant difference between 1*g* and 0*g* (Student's *t*-test, $P < 0.05$).

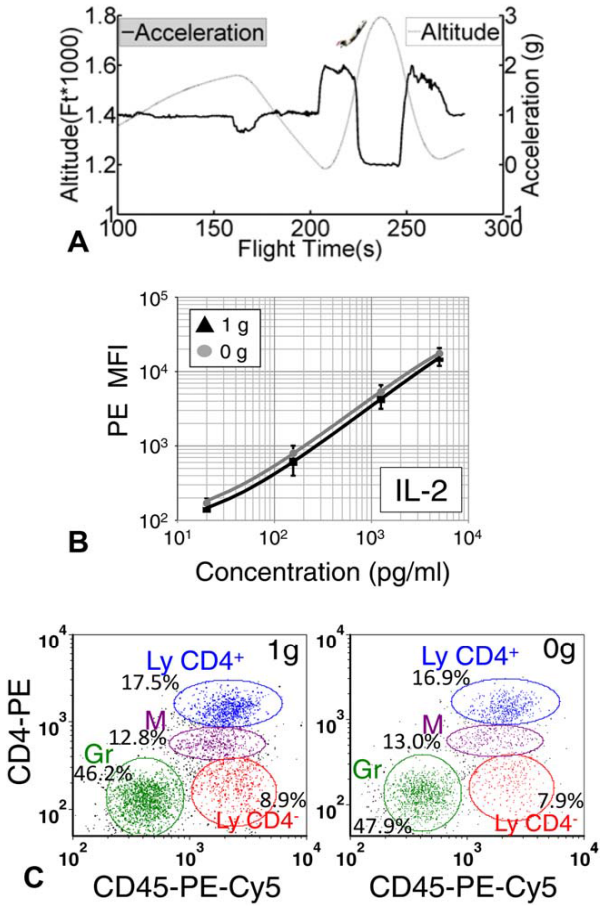


Figure 5. Performance of Microflow1 in microgravity during parabolic flights. (**A**) Illustration of altitude and acceleration during a parabola as a function of time. The bold line represents the acceleration pattern. The dotted line represents the altitude of the plane. (**B**) Standard curve for IL-2 based on the MFI in the PE channel of the four STD sub-populations analyzed in 1*g* (▲) or 0*g* (•) using the same Microflow1 unit and samples. Each point represents the mean ± SD of three independent measurements and there is no statistical difference between 1*g* and 0*g* values ($P > 0.05$). (**C**) Immunophenotyping was performed using anti-CD45-PECy5 and anti-CD4-PE staining for the discrimination of WBC with Microflow1 in 1*g* (left) or 0*g* (right). Gated WBC based on Side Scattering and CD45 expression were then plotted on CD4-PE and CD45-PE-Cy5 to enable discrimination of granulocytes (Gr), $CD4^+/CD4^-$ lymphocytes (Ly), and monocytes (M).

Microflow1 performance was independent of the gravitational force. Figure 5B shows the standard curves for IL-2 obtained with data collected when the CBA standard was analyzed by Microflow1 in 1*g* or in 0*g*. There was no statistical difference between the MFI of each bead population in the PE channel in both conditions. Due to the short microgravity period, both suboptimal sample injection from the cartridge and subsequent loss of bead concentration prevented accurate calculation of cytokine concentration from the MLR sample. To assess the impact of microgravity on immunophenotyping with surface stained blood cells, leukocytes were analyzed using Microflow1 (1*g*) on the ground and during parabola (0*g*). Figure 5C shows two CD4/CD45 scatter plots obtained with leukocytes analyzed in 1*g* (left) or 0*g* (right). Despite the lower number of cells due to the short microgravity period, it was clear that all leukocyte subsets were well discriminated. The proportion of leukocyte sub-populations was similar under both gravity levels (Table 2). These results suggest that Microflow1 performance in immunophenotyping analysis or cytokine concentration determination was not strongly affected by changes in gravity levels.

Performance in Orbit

The success of parabolic flight tests was followed by the construction of two space flight units for deployment and testing a flow cytometer on ground and on board the ISS for the first time in history. The demonstration was performed in the US Lab module of ISS (indicated by an arrow in Fig. 6A) by the Canadian astronaut Chris Hadfield (Fig. 6B). Using the same calibration bead mixture on the ground and on board the ISS, the performance of the Microflow1 flight unit was evaluated and compared with a second flight unit on the ground (Ground control). There was no significant difference in CV, background noise, and detection efficiency values

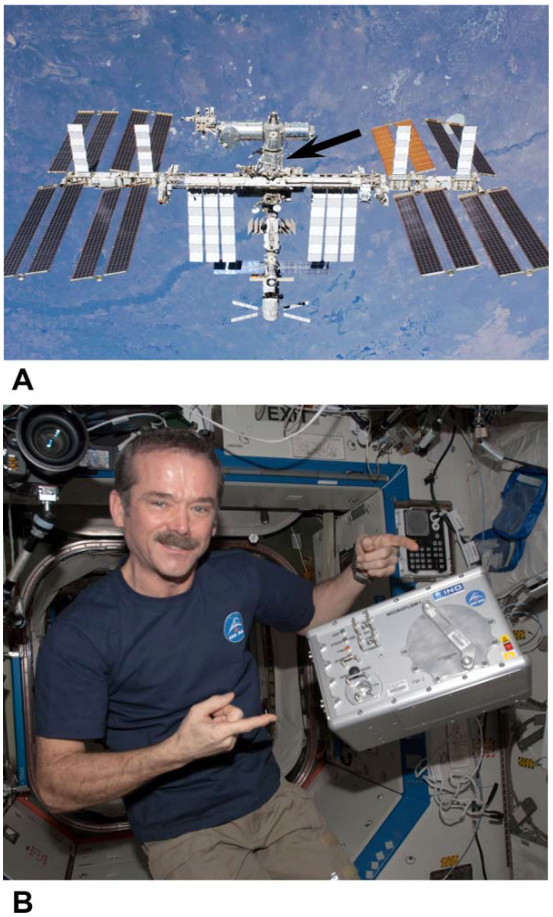


Figure 6. Location of the technology demonstration performed by Canadian astronaut Chris Hadfield on the ISS. (**A**) The US lab module where was performed the Microflow1 technology demonstration onboard the ISS is indicated by a black arrow. (**B**) The Microflow1 flight unit is floating near Canadian Astronaut Chris Hadfield who performed the technology demonstration.

calculated from flight and ground data, using split samples (Table 1). Background levels were slightly higher than in previous tests as expected, probably caused by the replacement of several components during assembly of the flight units.

The data for the first CBA standard sample was lost due to the presence of micro-bubbles in the instrument and the average of the two separate analyses in space could not be calculated. For the cytokine assay, only data from the second cartridge was used. On orbit analysis of the CBA standard and biological samples demonstrated that the quantification of cytokine concentrations was accurate in the space environment (Fig. 7A). The average difference between concentrations calculated from Microflow1 data in the ISS and FACS Array data on the ground was $1.4 \pm 0.1\%$. When comparing cytokine concentrations calculated with Microflow1 data on the ground and in the ISS, difference in cytokine concentrations was $1.1 \pm 0.1\%$ on average. No IL-4 could be detected in the sample analyzed in space, confirming that the instrument did not generate false positive results in microgravity.

Flight cartridges also contained fixed WBC stained for CD4 and CD45 expression. Figure 7B shows the CD4/CD45 scatter plots obtained following analysis with Microflow1 on the ground (left plot) and on the ISS (right plot), after gating on CD45 positive cells in the SSC/CD45 dot plot. Results show that the four WBC sub-populations have similar distribution patterns. The percentage of WBC sub-populations calculated from FACS Array (FA GC) and Microflow1 data on the ground (MCF GC) or on the ISS (MCF ISS) are presented in Table 2, showing a remarkable consistence in these proportions. Overall, these results demonstrated that the Microflow1 FOFC performed as well in low Earth orbit, after a high vibration rocket launch, as it did in a normal laboratory setting.

Discussion

An innovative FOFC supported the development of a portable, sheathless flow cytometer biomedical platform ideal for space applications. It was designed for a technology demonstration (Microflow1) that was performed on the ISS in March 2013 and was therefore limited to one excitation source, one scatter channel, and two fluorescence channels. Results demonstrate that this new instrument showed an excellent performance with the calibration bead mix as well as in immunophenotyping and bead-based multiplex assay. With a very small footprint, the instrument was able to function in a challenging environment both during parabolic flight, and in weightlessness that included exposure to a significant shock during rocket launch to get to ISS.

Considering the versatility of flow cytometers, it has been suggested that such instruments would be a great asset in future space missions (17). Previous attempts were made by other groups to test compact flow cytometers in weightlessness. A NASA team at Johnson Space Centre modified a Guava sheathless flow cytometer and established that it supported immunophenotyping in weightlessness, although in this case the CV's of cell populations increased under reduced gravity (18). Cell counting was also assessed on the ground and the Guava instrument underestimated leukocyte numbers. Another group at the California Institute of Technology tested a microfluidic system able to discrimination of lymphocytes in blood and demonstrated in parabolic flight that its performance was not affected by the absence of gravity (19). These previous studies confirmed the robustness of the sheathless and microfluidic approaches. In comparison, the Microflow1 system has a reduced footprint, and inherent resistance to vibrations and shock. Microflow1 platform could also support other flow cytometry assays currently performed on standard flow cytometers, with minor and non-impacting upgrades to the excitation or the optical chain. Preliminary tests with red and green lasers provide further confidence in the capacity of Microflow1 technology to analyze Luminex™ multiplexed bead assays in the future.

As an advantage for this FOFC, sample interrogation (fluorescence and scattering) is entirely achieved within the

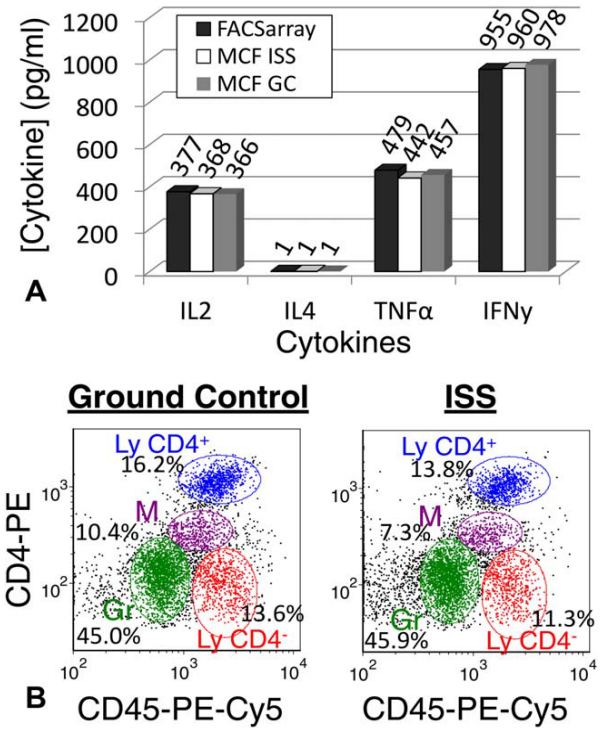


Figure 7. Performance of the Microflow1 unit on the ISS. (**A**) Cytokine concentrations obtained from the analysis of the same CBA samples with Microflow1 on board the ISS (MCF ISS) and on the ground with another Microflow1 unit (MCF GC) or with the FACS Array (FACS Array). (**B**) Analysis of WBC stained with anti-CD45-PECy5 and anti-CD4-PE antibodies with a Microflow1 unit on the ground (left) and onboard the ISS (right). Gated WBC based on Side Scattering and CD45 expression were then plotted on CD4-PE and CD45-PE-Cy5 to enable discrimination of granulocytes (Gr), $CD4^+/CD4^-$ lymphocytes (Ly) and monocytes (M).

core of a fiber-optic (Fig. 1B). The rectangular geometry of the excitation fiber ensures the uniform laser illumination and produces a transverse pattern with low speckle distribution (results not presented here). The consequence is, whatever the position of a particle or cell in the interrogation zone, the exposure to excitation light will be the same. The presence of index matching oil in the interstice between the capillary and the walls of the fiber provides limited stray light collection into the two side scatter fibers. This fiber-optic design not only enables miniaturization of the fluidic subsystem but also removes need for hydrodynamic focusing by a sheath fluid, and reduces the number of parts in the fluidic circuitry. Thereby waste fluid management is minimized, which is ideal for usage in remote and constrained environments. Furthermore, the fiberized flow cell system ensures correct and permanent positioning of the optics components, as previously noted (20). This feature further renders the system resilient to mechanical shocks and vibrations experienced during handling or launch. Results of this demonstration also revealed certain areas for improvement. The fluidic subsystem was not optimal, with occasional generation of air bubbles in its pathway, observed after the launch. The root cause of microbubbles is thought to be the presence of air in the PBS buffer or introduction of air at the cartridge/cytometer interface. A degassing procedures or alternative sample injection system could alleviate this problem.

Applications of Microflow1 for space life sciences research as well as on-orbit medical diagnostic are very promising. It is expected that a flow cytometer optimized for space applications could support real-time, on-orbit operations during routine medical monitoring or following medical emergencies. Multiplexed assays have great potential for biomedical diagnostics during future space missions, as cytokines and other blood factors have been shown to change in the course of a mission (21). Blood biomarkers could be assessed to monitor stress levels, bone degradation, cardiovascular adaptation, or response to radiation exposure for instance (22–25). Leukocyte counting would also be a major application, as this ISS medical requirement cannot currently be performed in orbit due to a lack of instrumentation (26). Work is ongoing to assess the precision of Microflow1 in leukocyte absolute counting. By selecting suitable excitation light source and filters, different reporter genes such as the Green Fluorescence Protein (GFP) could also be quantified in cell cultures, enabling real-time genetic studies on the ISS. The potential of this technology will rely on the availability of systems enabling sample preparation and introduction into the flow cytometer in the ISS environment. The implications of such a biomedical platform technology suggest diagnostic support for astronauts during future extended deep space flights and also extend to making possible portable and robust flow cytometry here on earth. Implementation of such a sheathless, easy-to-use,

automated, compact, remotely deployable flow cytometer is also attractive for many potential applications on earth from on-field blood bioanalysis for first responders to enabling point-of-care biomarker testing in geographically isolated communities (27–29). In conclusion, the success of this demonstration constitutes a major milestone for implementation of a modified flow cytometer as a robust biomedical platform on the International Space Station: a cornerstone achievement towards enabling health research and medical laboratory testing in the ultimate remote frontier of space.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Space Agency and the Institut National d'Optique. G. Dubeau-Laramée was supported by the FSWEP program and by a fellowship from University of Montreal. We are grateful to the Flight Research Laboratory (NRC, Ottawa) for an excellent support during parabolic flights and to Dr. Denis-Claude Roy (Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal) for providing cell culture supernatants. We would like to acknowledge Dr. Paul-François Paradis (INO) for the organization of the parabolic flights, Dr. Francis Mandy for advanced cytometry expertise and Dr. Marcus Dejmek (CSA) for assistance with parabolic flight experiments. This demonstration would not have been possible without the outstanding contribution of NASA and the excellent work in orbit of the Canadian astronaut Chris Hadfield.

Literature cited

1. Huang NT, Chen W, Oh BR, Cornell TT, Shanley TP, Fu J, Kurabayashi K. An integrated microfluidic platform for in situ cellular cytokine secretion immunophenotyping. Lab Chip 2012;12:4093–4101.
2. Frankowski M, Bock N, Kummrow A, Schadel-Ebner S, Schmidt M, Tuchscheerer A, Neukammer J. A microflow cytometer exploited for the immunological differentiation of leukocytes. Cytometry A 2011;79A:613–624.
3. Cho SH, Godin JM, Chen CH, Qiao W, Lee H, Lo YHCP. Review Article: Recent advancements in optofluidic flow cytometer. Biomicrofluidics 2010;4:43001.
4. Joo S, Kim KH, Kim HC, Chung TD. A portable microfluidic flow cytometer based on simultaneous detection of impedance and fluorescence. Biosens Bioelectron 2010; 25:1509–1515. England: 2009 Elsevier B.V.
5. Chung TD, Kim HC. Recent advances in miniaturized microfluidic flow cytometry for clinical use. Electrophoresis 2007;28:4511–4520.
6. Williams D, Kuipers A, Mukai C, Thirsk R. Acclimation during space flight: effects on human physiology. CMAJ 2009;180:1317–1323.
7. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. Aviat Space Environ Med 2008;79:835–843.
8. Gridley DS, Slater JM, Luo-Owen X, Rizvi A, Chapes SK, Stodieck LS, Ferguson VL, Pecaut MJ. Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. J Appl Physiol 2009;106:194–202.
9. Gridley DS, Dutta-Roy R, Andres ML, Nelson GA, Pecaut MJ. Acute effects of iron-particle radiation on immunity. Part II: leukocyte activation, cytokines and adhesion. Radiat Res 2006;165:78–87.
10. Kaur I, Simons ER, Castro VA, Ott CM, Pierson DL. Changes in monocyte functions of astronauts. Brain Behav Immun 2005;19:547–554.
11. Kaur I, Simons ER, Castro VA, Mark Ott C, Pierson DL. Changes in neutrophil functions in astronauts. Brain Behav Immun 2004;18:443–450.
12. Cohrs RJ, Mehta SK, Schmid DS, Gilden DH, Pierson DL. Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. J Med Virol 2008;80: 1116–1122.
13. Mehta SK, Stowe RP, Feiveson AH, Tyring SK, Pierson DL. Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. J Infectious Dis 2000;182: 1761–1764.
14. Pierson DL, Stowe RP, Phillips TM, Lugg DJ, Mehta SK. Epstein-Barr virus shedding by astronauts during space flight. Brain Behavior Immunity 2005;19:235–242.
15. Chase ES, Hoffman RA. Resolution of dimly fluorescent particles: a practical measure of fluorescence sensitivity. Cytometry 1998;33:267–279.
16. Brando B, Göhde W, Scarpati B, D'Avanzo G, Analysis EWGoCC. The "vanishing counting bead" phenomenon: effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis samples. Cytometry 2001;43:154–160.
17. Jett JH, Martin JC, Saunders GC, Stewart CC. Flow cytometry for health monitoring in space. Lunar Bases and Space Activities of the 21st Century 1985:687–698.
18. Crucian B, Sams C. Reduced gravity evaluation of potential spaceflight-compatible flow cytometer technology. Cytometry B Clin Cytom 2005;66B:1–9.
19. Shi W, Zheng S, Kasdan HL, Fridge A, Tai YC. Leukocyte count and two-part differential in whole blood based on a portable microflow cytometer. Transducers 2009.
20. Shapiro HM, Hercher M. Flow cytometers using optical waveguides in place of lenses for specimen illumination and light collection. Cytometry 1986;7:221–223.
21. Morukov B, Rykova M, Antropova E, Berendeeva T, Ponomaryov S, Larina I. T-cell immunity and cytokine production in cosmonauts after long-duration space flights. Acta Astronautica 2011;68:739–746.
22. Castillo L, MacCallum DM. Cytokine measurement using cytometric bead arrays. Methods Mol Biol 2012;845:425–434.
23. Khan A. Detection and quantitation of forty eight cytokines, chemokines, growth factors and nine acute phase proteins in healthy human plasma, saliva and urine. J Proteomics 2012;75:4802–4819. Netherlands: 2012 Elsevier B.V.
24. Craciun AM, Vermeer C, Eisenwiener HG, Drees N, Knapen MH. Evaluation of a bead-based enzyme immunoassay for the rapid detection of osteocalcin in human serum. Clin Chem 2000;46:252–257.
25. Smits GP, van Gageldonk PG, Schouls LM, van der Klis FR, Berbers GA. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of IgG serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus. Clin Vaccine Immunol 2012;19:396–400. United States.
26. Hamilton D, Smart K, Melton S, Polk JD, Johnson-Throop K. Autonomous medical care for exploration class space missions. J Trauma 2008; 64:S354–S363. United States.
27. Handyem. www.handyem.com. Retrieved October 25; 2013.
28. Fortin M, Chandonnet A, Pare C; Institut National D'Optique, assignee. Flow cytometry analysis across optical fiber. Canada. 2013 September 17, 2013.
29. Beaulieu R, Fortin M, Cournoyer A; Institut National D'Optique, assignee. Flow Cytometry Analysis Across Optical Fiber. Canada. 2010 November 16, 2010.

Discussion

La surveillance de la santé des astronautes lors des voyages spatiaux représente un enjeu important de la poursuite de l'exploration et de l'habitation spatiale. Pour ce faire, il faut impérativement comprendre les mécanismes responsables des variations immunitaires observées en cours de séjours à bord de la SSI mais aussi trouver un moyen efficace et fiable afin d'obtenir ces informations. Notre premier objectif était de déterminer si le stress imposé par la microgravité pouvait avoir un effet sur la réponse immunitaire mémoire. Étant donné la fréquence élevée de réactivation virale chez les astronautes, une diminution de la réponse des lymphocytes T CD8+ mémoires, habituellement responsables du maintient de la latence de ces virus, pourrait expliquer ce phénomène. L'impact des hormones de stress sur la réponse immunitaire adaptative primaire est bien documenté sur Terre (revue dans (Dhabhar, 2009; Dragos and Tanasescu, 2010)) mais peu étudié en situation de gravité réduite. Ce manque de connaissances en microgravité est principalement dû au fait que les variables sont multiples lors des voyages spatiaux tels que la durée du séjour et le petit nombre de sujet. Cependant, la lacune principale des études immunologiques en sciences de la vie dans l'espace est qu'il n'existe aucune plateforme capable d'analyser des échantillons biologiques *in situ*. Ainsi, les échantillons doivent être acheminés au sol pour ensuite être traités et analysés. Notre second objectif était de remédier à cette situation et de créer une plateforme compatible avec les exigences des vols spatiaux tout en maintenant les standards élevés des analyses biomédicales cliniques.

Les glucocorticoïdes sont connus pour leur effet pro-apoptotique sur différents sous-types de leucocytes dont les thymocytes et les lymphocytes matures (Galili, 1983; Iseki et al., 1991). Nos résultats démontrent un effet négatif de la corticostérone – un analogue murin du cortisol – sur la survie des lymphocytes T CD8+ mémoires centraux *in vitro*. Ces cellules au repos exposées à une concentration physiologique de corticostérone correspondant à un stress chronique (10^{-6}M) pendant 24h présentaient un niveau d'apoptose élevé et ce malgré la présence d'une faible quantité (20ng/ml) d'IL-15, une cytokine essentielle à leur survie (Berard et al., 2003). Cependant, nous avons constaté que l'IL-15 réduisait l'apoptose induite par la corticostérone d'une manière dose-dépendante. L'ajout d'IL-15 au sein d'un cocktail

visant à prévenir les déficiences immunitaires chez les astronautes en cours de vol pourrait s'avérer bénéfique puisqu'elle protège en partie contre l'apoptose des lymphocytes mémoires induite par les hormones de stress. Il serait cependant nécessaire d'inclure un moyen de contrôler la concentration d'IL-15 afin d'éliminer les effets secondaires potentiels d'une surdose d'IL-15 dans l'organisme. Par exemple, cette cytokine peut induire la survie de lymphocytes autoréactifs ce qui pourrait provoquer des maladies autoimmunes telle que l'arthrite rhumatoïde ou une sécrétion excessive de cytokines proinflammatoires telle que le TNFα (McInnes et al., 1997).

Une analyse de la cinétique de la mortalité des lymphocytes T CD8+ mémoires centraux en culture avec la corticostérone a permis de constater que l'apoptose apparaissait dès les 6 premières heures d'une stimulation sur 24h. Ce constat pourrait impliquer une régulation des facteurs de transcriptions par le récepteur de l'IL-15, inhibant les acteurs de sa voie de signalisation et par le fait même son effet anti-apoptotique. Cette cytokine essentielle à survie des lymphocytes mémoires après la résorption de la réponse adaptative primaire agit par l'intermédiaire de la molécule STAT5 qui se dimérise et active des gènes qui stimulent le cycle cellulaire et la survie des lymphocytes CD8+ mémoires (Hand et al., 2010). L'analyse des niveaux de STAT5 dans les Tcm en présence de doses croissantes d'IL-15 a démontré une élévation concordante de la protéine phosphorylée et donc activée. La présence de l'hormone de stress n'affecterait pas les événements précoces de la voie de signalisation de l'IL-15 tels que la signalisation du récepteur IL-15Rα ou la phosphorylation des kinases JAK menant à la phosphorylation de la protéine STAT5. Ces résultats doivent cependant être reconfirmés afin d'obtenir un échantillonnage représentatif et statistiquement significatif.

Le facteur de transcription NF-κB est influencé par un grand nombre de voies de signalisation chez les lymphocytes mémoires dont la voie des glucocorticoïdes et de l'IL-15 (Hettmann et al., 2003; Ray et al., 1995). Son activité est régulée par une protéine inhibitrice (IκBα) qui est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome lorsque la cellule est activée afin de permettre la translocation de NF-κB dans le noyau ce qui déclenche la transcription de nombreux facteurs anti-apoptotiques et cytokines proinflammatoires (revue dans (Barnes, 1997)). Il est connu que les glucocorticoïdes peuvent causer l'apoptose en inhibant directement la translocation de NF-κB ou alors en augmentant la transcription de la protéine

IkBα ce qui empêche l'activation de NF-κB (Ray et al., 1995). D'après les résultats obtenus, l'hormone de stress ne semble pas induire l'apoptose en augmentant la transcription du gène de la protéine inhibitrice de NF-κB chez les Tcm, ce qui n'exclut cependant pas que le complexe GC-GCR puisse se lier directement à NF-κB et empêcher sa translocation et conséquemment son action anti-apoptotique.

La liaison de l'IL-15 à son récepteur mène à l'activation du facteur de transcription AP-1, nécessaire entre autres à la sécrétion de l'IL-2. Il est aussi connu que les glucocorticoïdes jouent un rôle inhibiteur sur ce facteur de transcription (Yang-Yen et al., 1990). Ainsi, il est possible que l'ajout de doses supra-physiologiques d'IL-15 permette de compétitionner avec l'inhibition induite par les glucocorticoïdes ou alors augmente suffisamment les niveaux d'IL-2 afin que la prolifération soit plus grande que la mort cellulaire. En plus de jouer son rôle de promoteur de la survie cellulaire par la voie de signalisation JAK3/Stat5, l'IL-15 mène à l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT menant à l'augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L. La dexaméthasone (DEX), un analogue synthétique de la corticostérone semble aussi jouer un rôle dans l'expression de certains membres de la famille de Bcl-2. Ainsi, l'apoptose induite par l'hormone de stress pourrait s'expliquer par une augmentation des protéines pro-apoptotiques telles que BIM. De plus, l'ajout de doses massives d'IL-15 augmentant les niveaux d'expression des protéines anti-apoptotiques de famille de Bcl-2 pourrait expliquer que nous ayons observé une diminution de la mort cellulaire malgré nos résultats négatifs concernant les niveaux de BIM. Malgré l'absence de variation de BIM dans les Tcm, une augmentation importante des protéines prévenant l'apoptose pourrait suffire à faire pencher la balance vers la survie cellulaire malgré la présence d'hormones de stress.

Nos résultats démontrent que la corticostérone n'agit pas en aval de STAT5 et d'IkBa dans la voie de signalisation de l'IL-15 et du NF-κB menant à l'apoptose des lymphocytes T CD8+ mémoires centraux. Cependant d'autres éléments en amont de ces voies de signalisation pourraient être affectés par la présence des hormones de stress. Il serait aussi possible que l'action de la corticostérone se situe au niveau de facteurs de transcriptions tels que *c-jun* et *c-fos*, tous deux nécessaires à l'activation du complexe AP-1. Le récepteur des glucocorticoïdes

et le complexe AP-1 ont des rôles antagonistes au niveau de la transcription des gènes cibles. Ainsi, l'augmentation massive d'IL-15 menant à l'activation d'AP-1 pourrait expliquer la diminution de l'apoptose induite par les glucocorticoïdes observés dans notre modèle. Le facteur de transcription c-myc pourrait aussi être une cible potentielle impliquée dans l'inhibition par l'IL-15 de l'apoptose induite par la corticostérone. Chez la souris, il a été observé qu'une déficience en c-myc menait à une diminution de la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD8+CD44+ ainsi qu'à une diminution de leur sensibilité à l'IL-15 (Bianchi et al., 2006). Thompson et coll, ont quant à eux démontré que l'apoptose induite par la dexaméthasone était accompagnée par une diminution de c-myc et qu'une surexpression de ce protooncogène inhibait l'apoptose (Thompson, 1998). Ainsi, la signalisation par l'IL-15 induirait la survie homéostatique des Tcm via c-myc, ce qui pourrait permettre de surpasser l'inhibition par les GCs.

Finalement, l'IL-15 mène aussi à l'augmentation de l'expression d'une protéine membre de la famille des TNFR induite par les glucocorticoides (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein* (GITR)) à la surface des lymphocytes T CD8+ mémoires (Snell et al., 2012). Cette protéine est une molécule costimulatrice de la famille des récepteurs du TNF impliquée dans la prolifération des lymphocytes T CD8 durant la réponse immunitaire ainsi que leur survie *in vivo* (Lin et al., 2013; Ronchetti et al., 2004; Snell et al., 2010). Ce récepteur est aussi de plus en plus reconnu pour ses propriétés costimulatrice des T effecteurs et Treg et donc pour ses effets anti tumoraux (Nocentini et al., 2012; Schaer et al., 2012). La liaison de GITR avec son ligand (GITRL) induit l'activation de la voie NF-κB ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de Bcl-X_L via TRAF2 et TRAF5 (Snell et al., 2010). Nos résultats confirment que l'expression de GITR est augmentée à la surface des lymphocytes T CD8 mémoires d'une manière dose-dépendante par l'IL-15. Le fait que la signalisation de GITR par TRAF2/5 active à la fois la voie de signalisation classique et non classique de NF-κB pourrait expliquer nos observations (Hauer et al., 2005). Par exemple, si la corticostérone bloque physiquement l'entrée de NF-κB dans le noyau inhibant la signalisation classique de cette voie, l'activation de la voie non classique via GITR pourrait inhiber l'apoptose induite par l'hormone de stress.

Un deuxième objectif important de ce projet était de développer et valider une plateforme de cytométrie en flux compatible avec le vol spatial qui permettrait d'analyser la fonction immunitaire des astronautes à bord de la SSI. De nombreux éléments de la réponse immunitaire tels que les modifications au niveau des sous-populations leucocytaires, la réponse à la stimulation *in vitro* ou la réactivation virale en lien avec les voyages spatiaux. Cependant, la plupart de ces observations ou expérimentations doivent être faites à partir d'échantillons collectés en vol puis retournés sur Terre afin d'être analysés ou alors en comparant les données avant et après un certain temps en microgravité. Il n'existe donc actuellement aucune plateforme permanente à bord de la SSI qui permettrait d'analyser des échantillons biologiques *in situ* en temps réel et d'obtenir des informations quant à la fonction du système immunitaire en cours de vol. De plus, une plateforme permettant des analyses biologiques en microgravité serait aussi un atout majeur pour la recherche en sciences de la vie dans l'espace puisqu'il serait possible, par exemple, d'évaluer les concentrations relatives des sous-populations leucocytaires dans le sang ou même d'étudier le cycle cellulaire en absence de gravité.

Une plateforme de cytométrie en flux compatible avec le voyage spatial et son utilisation à bord de la SSI devrait donc être robuste, miniaturisée et éliminer l'utilisation des lasers tout en maintenant les standards élevés requis pour le diagnostic et la recherche. De plus, son utilisation ne devrait pas impliquer la création d'une grande quantité de fluides biologiques et une rapidité et facilité d'exécution pour des utilisateurs minimalement formés. C'est dans cette optique qu'une collaboration de l'Institut National d'Optique (INO) avec l'Agence Spatiale Canadienne (ASC) a permis la création du Microflow-1, une plateforme de cytométrie en flux miniaturisée, robuste et efficace en microgravité.

Il est bien connu que les fluides ne se comportent pas de la même manière en absence de gravité. Ainsi, le système fluidique du Microflow-1 a été adapté afin d'éliminer l'utilisation du liquide de gaine habituellement nécessaire au focus hydrodynamique d'un cytomètre conventionnel. Par le fait même, cette modification diminue aussi la quantité de liquide nécessaire à l'analyse en flux en plus de réduire considérablement les déchets biologiques produits par l'appareil. Une innovation majeure au système optique est le remplacement du laser par des diodes électroluminescentes (DEL) qui conduisent la lumière au travers de fibres

optiques assemblées ensemble au sol, ce qui élimine le besoin de réaligner le laser et rend le système assez robuste pour supporter un lancement de navette. L'utilisation de capillaires et de fibres optique pour les systèmes de fluidique et d'optique a permis de diminuer la taille et le poids du Microflow-1 jusqu'à 13.4"X9.6"X8.2" pour 10.4kg, ce qui est significativement plus petit et léger qu'un cytomètre commercial.

Afin de tester la technologie du Microflow-1, deux protocoles ont été utilisés. Le premier était un immunophénotypage et le second était un test utilisant des microbilles de polystyrène spécifiques pour certaines cytokines. Les tests au sol n'ayant démontré aucune différence significative entre le Microflow-1 et le FACS Array, les essais suivants ont été effectués en vols paraboliques permettant de recréer la microgravité. Toujours en utilisant les mêmes tests immunologiques, nous avons démontré que le Microflow-1 permet une analyse fiable et stable et ce malgré la gravité réduite au moment de l'analyse des échantillons. La seule problématique rencontrée au cours de cette expérimentation a été l'impossibilité d'obtenir assez de billes dans un des échantillons ce qui est aisément explicable. En effet, dû à une période de microgravité de seulement 20 secondes et une quantité trop faible de billes au départ, il a été impossible de calculer les concentrations en cytokines présentes dans l'échantillon. Nous étions confiants que cette problématique pourrait être résolue lors des prochains essais en augmentant la concentration en billes de notre échantillon et que ce résultat n'altérait en rien les capacités d'analyse du Microflow-1 en microgravité.

Ces premiers résultats concluants nous ont permis d'intégrer le Microflow-1 dans la mission spatiale pilotée par l'astronaute canadien Chris Hadfield à bord de la SSI en mars 2013. Deux sessions de cytométrie en flux à l'aide de la nouvelle plateforme ont été effectuées à quelques jours d'intervalles à bord de la station. Nous avons d'abord pu constater que le Microflow-1 avait bien résisté à l'accélération et aux chocs du lancement et qu'il était effectivement assez facile à installer et à utiliser par un astronaute qui n'avait pas été formé préalablement. Nous avons toutefois pu remarquer que des bulles d'air étaient présentes dans le système de fluidique probablement dû à leur introduction lors de l'assemblage du système ou à leur présence dans les fluides utilisés pour les échantillons (PBS). Cette situation pourrait cependant être améliorée en ajoutant des étapes de dégazage avant l'insertion des échantillons

de même que le système de cartouche lui-même pourrait être modifié sur la prochaine version du Microflow afin d'éliminer la probabilité d'introduire des bulles dans la fluidique.

L'intégration d'une plateforme de cytométrie en flux est réclamée à bord de la station spatiale de puis de nombreuses années (Jett et al., 1984). Dû à sa grande polyvalence en terme d'analyse cellulaire et immunologique, ce type d'instrument pourrait permettre de suivre la fonction immunitaire des astronautes *in situ* lors de voyages de longues durée en orbite autour de la Terre, un voyage habité vers Mars ou même sur une base lunaire permanente. C'est dans cette optique qu'il est essentiel de bien comprendre la fonction immunitaire des astronautes soumis au stress important que représentent les voyages spatiaux et qu'il devient nécessaire d'avoir une technologie en place qui présente d'excellentes capacités en microgravité. La création et la validation en microgravité du Microflow-1 représente une étape majeur vers cet objectif. Il pourrait ainsi être possible de composer des essais à l'aide de billes de polystyrène, telles que les Luminex^{TM}, spécifiques pour des composantes clés de la fonction immunitaire mémoire et de la réactivation virale. Grâce à nos résultats *in vitro* nous avons pu identifier que la corticostérone, hormone de stress murine analogue au cortisol, provoquait l'apoptose des lymphocytes T CD8 mémoires. De plus, nous avons démontré que l'IL-15, une cytokine essentielle à la survie des ces mêmes lymphocytes, permettait d'inhiber cet effet de l'hormone de stress de façon dose-dépendante. Bien que les acteurs des voies de signalisation en aval de la signalisation par l'IL-15 ou la corticostérone restent à être identifiés plus spécifiquement, il serait envisageable d'utiliser un panel de microbilles permettant, à l'aide du Microflow-1, d'évaluer les concentrations des cytokines nécessaires à la réponse immunitaire mémoire telles que l'IL-15, l'IL-7, l'IL-2 ou l'IFNγ et des différentes hormones de stress comme le cortisol, l'adrénaline ou la noradrénaline dans les liquides biologiques. Des tests préliminaires ont été effectués en utilisant la plateforme Microflow-1 en laboratoire et ont démontré d'excellentes capacités de discrimination et d'analyse des concentrations des différents éléments de l'essai. Ce projet aura non seulement permis de découvrir l'effet de la corticostérone sur les lymphocytes T CD8 mémoires mais aussi de créer une plateforme innovante afin de permettre l'analyse du système immunitaire mémoire pendant les vols spatiaux, importante source de stress sur l'organisme.

Conclusion

L'exploration spatiale représente une occasion unique de découvrir l'univers qui nous entoure. Cependant, les conséquences physiologiques sur le corps humain engendrées par le stress causé par le voyage spatial ne commencent qu'à peine à être connues. Les systèmes généraux tels que la fonction cardiaque, cérébrale ou sanguine sont connus pour être affectés par la gravité réduite à bord de la station spatiale internationale mais les mécanismes moléculaires impliquées dans ces modifications restent pour la plupart mal connus. De plus, les agences spatiales internationales doivent implémenter des éléments de prévention afin d'améliorer et de maintenir la santé des astronautes en cours de vol puisque très peu d'appareils cliniques de dépistage ou de traitement existent à bord de la station.

En observant les impacts du stress sur la santé immunitaire sur Terre, nous en avons déduis l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes T CD8+ mémoires qui contrôlent les virus latents pourraient être moins fonctionnels dû à la présence d'hormone de stress. Il serait alors possible d'expliquer la recrudescence importante des titres viraux auparavant latents ainsi que la diminution de la fonction lymphocytaire préalablement observées chez les astronautes pendant et après les vols spatiaux. Un modèle murin *in vitro* de stress a d'abord été élaboré et nous as permis d'observer que la présence de cortisol dans l'environnement de culture de lymphocytes T CD8+ mémoires centraux au repos provoquait l'apoptose. Ainsi, certaines déficiences dans la fonction immunitaire des astronautes pourraient être dues à l'apoptose des lymphocytes mémoires plutôt qu'à une diminution de leurs fonctions.

Dans l'optique d'identifier ces conséquences immunitaires durant les voyages spatiaux, il était essentiel de trouver un moyen d'étudier ces phénomènes à bord de la station spatiale internationale. C'est dans cet esprit qu'à été créé et testé le Microflow-1, une plateforme de cytométrie en flux compacte et robuste compatible avec le vol spatial. Cet appareil a notamment démontré d'excellentes capacités d'analyse des leucocytes du sang périphérique ainsi que dans la quantification des niveaux de cytokines dans des échantillons biologiques à l'aide de tests basés sur des microbilles. De plus, des essais au sol ont été effectués avec des billes Luminex™ et une version d'ingénierie du Microflow-1. Ceux-ci ont permis de tester les capacités du Microflow-1 en termes d'efficacité de détection et de discrimination de billes

dans un petit volume. Cette plateforme nous a permis de discriminer jusqu'à 7 populations de billes différentes et donc d'obtenir simultanément les concentrations de cytokines et de récepteurs solubles en lien avec la fonction immunitaire contenus dans un même échantillon.

En approfondissant ces méthodes, il serait possible de créer un test contenant une multitude de billes spécifiques pour des biomarqeurs liés à une déficience immunitaire à bord de la station spatiale. Il serait par exemple possible d'observer les variations en concentrations de cytokines proinflammatoires telles que le TNFα ou l'IFNγ en analysant quelques microlitres de sang ou alors les niveaux de cortisol et d'adrénaline en cours de vol. La possibilité d'effectuer un compte absolu de leucocytes grâce au Microflow-1 représente aussi un avantage important de cette nouvelle technologie. Il s'agit du premier pas vers une plateforme clinique capable de voyager dans des régions éloignées où les conditions climatiques ou l'isolement n'affecte pas son rendement. Nos résultats ont permis de mieux comprendre la fonction immunitaire en situation de stress en plus de s'approcher d'une application qui pourrait permettre à chacun d'effectuer différentes analyses immunitaires directement dans son environnement.

Bibliographie

(NASA), N.A.a.S.A. (2014). Space Linear Acceleration Mass Measurement Device (SLAMMD).

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2007). Cellular and molecular immunology, 6th edn (Philadelphia: Saunders Elsevier).

Abrams, M.T., Robertson, N.M., Yoon, K., and Wickstrom, E. (2004). Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. J Biol Chem *279*, 55809-55817.

Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. Nature reviews. Immunology *3*, 939-951.

Akbar, A.N., Borthwick, N.J., Wickremasinghe, R.G., Panayoitidis, P., Pilling, D., Bofill, M., Krajewski, S., Reed, J.C., and Salmon, M. (1996). Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. European journal of immunology *26*, 294-299.

Akira, S. (2000). The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. Cytokine & growth factor reviews *19*, 2566-2576.

Alangari, A.A. (2014). Corticosteroids in the treatment of acute asthma. Ann Thorac Med *9*, 187-192.

Alegre, M.L., Shiels, H., Thompson, C.B., and Gajewski, T.F. (1998). Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *161*, 3347-3356.

Almawi, W.Y., Beyhum, H.N., Rahme, A.A., and Rieder, M.J. (1996). Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. J Leukoc Biol *60*, 563-572.

Alnemri, E.S., Fernandes, T.F., Haldar, S., Croce, C.M., and Litwack, G. (1992). Involvement of BCL-2 in glucocorticoid-induced apoptosis of human pre-B-leukemias. Cancer research *52*, 491-495.

Amsterdam, A., Tajima, K., and Sasson, R. (2002). Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. In Biochem Pharmacol (England), pp. 843-850.

Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. The Journal of investigative dermatology *126*, 32-41.

Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A.*, et al.* (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat Med *8*, 379-385.

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science *270*, 286-290.

Aurelian, L., Editors-in-Chief: , B.W.J.M., and Regenmortel, M.H.V.v. (2008). Herpes Simplex Viruses: General Features. In Encyclopedia of Virology (Third Edition) (Oxford: Academic Press), pp. 383-397.

Aviles, H., Belay, T., Vance, M., and Sonnenfeld, G. (2005). Effects of space flight conditions on the function of the immune system and catecholamine production simulated in a rodent model of hindlimb unloading. Neuroimmunomodulation *12*, 173-181.

Badovinac, V.P., Haring, J.S., and Harty, J.T. (2007). Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. Immunity *26*, 827-841.

Baerwald, C., Graefe, C., von Wichert, P., and Krause, A. (1992). Decreased density of beta-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. The Journal of rheumatology *19*, 204-210.

Bakos, A., Varkonyi, A., Minarovits, J., and Batkai, L. (2001). Effect of simulated microgravity on human lymphocytes. J Gravit Physiol *8*, P69-70.

Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2010). Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *185*, 4988-4992.

Barnes, P.J. (1997). Nuclear factor-kappa B. The international journal of biochemistry & cell biology *29*, 867-870.

Barnes, P.J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. Clin Sci (Lond) *94*, 557-572.

Bartholome, B., Spies, C.M., Gaber, T., Schuchmann, S., Berki, T., Kunkel, D., Bienert, M., Radbruch, A., Burmester, G.R., Lauster, R.*, et al.* (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J *18*, 70-80.

Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. J Exp Med *195*, 1541-1548.

Benedict, C.A., Angulo, A., Patterson, G., Ha, S., Huang, H., Messerle, M., Ware, C.F., and Ghazal, P. (2004). Neutrality of the canonical NF-kappaB-dependent pathway for human and murine cytomegalovirus transcription and replication in vitro. Journal of virology *78*, 741-750.

Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S., and Tough, D.F. (2003). IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *170*, 5018-5026.

Bertram, E.M., Dawicki, W., and Watts, T.H. (2004). Role of T cell costimulation in anti-viral immunity. In Seminars in immunology (United States), pp. 185-196.

Bertram, E.M., Lau, P., and Watts, T.H. (2002). Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *168*, 3777-3785.

Besedovsky, H.O., and del Rey, A. (2000). The cytokine-HPA axis feed-back circuit. Zeitschrift fur Rheumatologie *59 Suppl 2*, II/26-30.

Bevan, M.J. (2011). Memory T cells as an occupying force. European journal of immunology *41*, 1192-1195.

Bianchi, M., Meng, C., and Ivashkiv, L.B. (2000). Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 9573-9578.

Bianchi, T., Gasser, S., Trumpp, A., and MacDonald, H.R. (2006). c-Myc acts downstream of IL-15 in the regulation of memory CD8 T-cell homeostasis. Blood *107*, 3992-3999.

Bonneau, R.H. (1996). Stress-induced effects on integral immune components involved in herpes simplex virus (HSV)-specific memory cytotoxic T lymphocyte activation. Brain Behav Immun *10*, 139-163.

Bonneau, R.H., Sheridan, J.F., Feng, N.G., and Glaser, R. (1991). Stress-induced effects on cell-mediated innate and adaptive memory components of the murine immune response to herpes simplex virus infection. Brain Behav Immun *5*, 274-295.

Boonyaratanakornkit, J.B., Cogoli, A., Li, C.F., Schopper, T., Pippia, P., Galleri, G., Meloni, M.A., and Hughes-Fulford, M. (2005). Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. Faseb j *19*, 2020-2022.

Borchers, A.T., Keen, C.L., and Gershwin, M.E. (2002). Microgravity and immune responsiveness: implications for space travel. Nutrition *18*, 889-898.

Bowers, S.L., Bilbo, S.D., Dhabhar, F.S., and Nelson, R.J. (2008). Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. Brain Behav Immun *22*, 105-113.

Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R.L., Cepero, E., and Boise, L.H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. BMC cell biology *14*, 32.

Bros, M., Jahrling, F., Renzing, A., Wiechmann, N., Dang, N.A., Sutter, A., Ross, R., Knop, J., Sudowe, S., and Reske-Kunz, A.B. (2007). A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. Blood *109*, 3820-3829.

Broskey, J., and Sharp, M.K. (2007). Evaluation of mechanisms of postflight orthostatic intolerance with a simple cardiovascular system model. Annals of biomedical engineering *35*, 1800-1811.

Bruning, A.H., and Samie, M.H. (1994). Recurrent herpes zoster and high-dose inhaled steroids for asthma. South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde *84*, 873.

Buckey, J.C. (2006). Space physiology. (New York ; Oxford, Oxford University Press, MyiLibrary Ltd.,), pp. xv, 283 p. ill 224 cm.

Budagian, V., Bulanova, E., Paus, R., and Bulfone-Paus, S. (2006). IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. Cytokine Growth Factor Rev *17*, 259-280.

Bulfone-Paus, S., Ungureanu, D., Pohl, T., Lindner, G., Paus, R., Ruckert, R., Krause, H., and Kunzendorf, U. (1997). Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. Nature medicine *3*, 1124-1128.

Bunting, K.D., Bradley, H.L., Hawley, T.S., Moriggl, R., Sorrentino, B.P., and Ihle, J.N. (2002). Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. Blood *99*, 479-487.

Bush, K.A., Krukowski, K., Eddy, J.L., Janusek, L.W., and Mathews, H.L. (2012). Glucocorticoid receptor mediated suppression of natural killer cell activity: identification of associated deacetylase and corepressor molecules. In Cellular immunology (United States: 2012 Elsevier Inc), pp. 80-89.

Cabal-Hierro, L., and Lazo, P.S. (2012). Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. Cell Signal *24*, 1297-1305.

Cantin, E., Tanamachi, B., Openshaw, H., Mann, J., and Clarke, K. (1999). Gamma interferon (IFN-gamma) receptor null-mutant mice are more susceptible to herpes simplex virus type 1 infection than IFN-gamma ligand null-mutant mice. Journal of virology *73*, 5196-5200.

Carrio, R., Rolle, C.E., and Malek, T.R. (2007). Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. European journal of immunology *37*, 3078-3088.

Cepero, E., King, A.M., Coffey, L.M., Perez, R.G., and Boise, L.H. (2005). Caspase-9 and effector caspases have sequential and distinct effects on mitochondria. Oncogene *24*, 6354-6366.

Chang, T.T., Walther, I., Li, C.F., Boonyaratanakornkit, J., Galleri, G., Meloni, M.A., Pippia, P., Cogoli, A., and Hughes-Fulford, M. (2012). The Rel/NF-kappaB pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. J Leukoc Biol.

Charles, J.B., and Lathers, C.M. (1991). Cardiovascular adaptation to spaceflight. Journal of clinical pharmacology *31*, 1010-1023.

Chen, W. (2013). Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) *31*, 137-161.

Chrousos, G.P., and Gold, P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA : the journal of the American Medical Association *267*, 1244-1252.

Cohrs, R.J., Mehta, S.K., Schmid, D.S., Gilden, D.H., and Pierson, D.L. (2008). Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. J Med Virol *80*, 1116-1122.

Coskun, O., Sener, K., Kilic, S., Erdem, H., Yaman, H., Besirbellioglu, A.B., Gul, H.C., and Eyigun, C.P. (2010). Stress-related Epstein-Barr virus reactivation. Clinical and experimental medicine *10*, 15-20.

Croft, M. (2003a). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? In Nature reviews. Immunology (England), pp. 609-620.

Croft, M. (2003b). Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. In Cytokine & growth factor reviews (England), pp. 265-273.

Crucian, B., Lee, P., Stowe, R., Jones, J., Effenhauser, R., Widen, R., and Sams, C. (2007). Immune system changes during simulated planetary exploration on Devon Island, high arctic. BMC Immunol *8*, 7.

Crucian, B., and Sams, C. (2005). Reduced gravity evaluation of potential spaceflight-compatible flow cytometer technology. Cytometry. Part B, Clinical cytometry *66*, 1-9.

Crucian, B., Stowe, R., Mehta, S., Uchakin, P., Quiriarte, H., Pierson, D., and Sams, C. (2012). Immune System Dysregulation Occurs During Short Duration Spaceflight On Board the Space Shuttle. J Clin Immunol.

Crucian, B., Stowe, R., Mehta, S., Uchakin, P., Quiriarte, H., Pierson, D., and Sams, C. (2013). Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle. J Clin Immunol *33*, 456-465.

Crucian, B., Stowe, R., Quiriarte, H., Pierson, D., and Sams, C. (2011). Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight. Aviat Space Environ Med *82*, 857-862.

Crucian, B.E., Cubbage, M.L., and Sams, C.F. (2000). Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. J Interferon Cytokine Res *20*, 547-556.

Crucian, B.E., Stowe, R.P., Pierson, D.L., and Sams, C.F. (2008). Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. Aviat Space Environ Med *79*, 835-843.

Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J.S., Craft, J., and Kaech, S.M. (2011). An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells. Immunity *35*, 792-805.

Cunnick, J.E., Lysle, D.T., Kucinski, B.J., and Rabin, B.S. (1990). Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones and peripheral beta-adrenergic receptors. Pharmacology, biochemistry, and behavior *36*, 645-651.

Cupps, T.R., Gerrard, T.L., Falkoff, R.J., Whalen, G., and Fauci, A.S. (1985). Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation. The Journal of clinical investigation *75*, 754-761.

Cutolo, M., Buttgereit, F., and Straub, R.H. (2011). Regulation of glucocorticoids by the central nervous system. Clin Exp Rheumatol *29*, S-19-22.

Darnell, J.E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. Science *277*, 1630-1635.

Dayyani, F., Belge, K.U., Frankenberger, M., Mack, M., Berki, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2003). Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. J Leukoc Biol *74*, 33-39.

de Kloet, E.R., Joels, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. Nature reviews. Neuroscience *6*, 463-475.

Decker, T., and Meinke, A. (1997). Jaks, Stats and the immune system. Immunobiology *198*, 99-111.

Decman, V., Freeman, M.L., Kinchington, P.R., and Hendricks, R.L. (2005). Immune control of HSV-1 latency. Viral Immunol *18*, 466-473.

Dhabhar, F.S. (2009). Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. In Neuroimmunomodulation (Switzerland: 2009 S. Karger AG, Basel.), pp. 300-317.

Dittmar, K.D., and Pratt, W.B. (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. J Biol Chem *272*, 13047-13054.

Dragos, D., and Tanasescu, M.D. (2010). The effect of stress on the defense systems. Journal of medicine and life *3*, 10-18.

Duttagupta, P.A., Boesteanu, A.C., and Katsikis, P.D. (2009). Costimulation signals for memory CD8+ T cells during viral infections. In Crit Rev Immunol (United States), pp. 469-486.

Engler, H., Bailey, M.T., Engler, A., and Sheridan, J.F. (2004). Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. Journal of neuroimmunology *148*, 106-115.

Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L., Adams, J.M., Strasser, A., and Villunger, A. (2005). BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. Blood *106*, 4131-4138.

Flint, M.S., Budiu, R.A., Teng, P.N., Sun, M., Stolz, D.B., Lang, M., Hood, B.L., Vlad, A.M., and Conrads, T.P. (2011). Restraint stress and stress hormones significantly impact T lymphocyte migration and function through specific alterations of the actin cytoskeleton. In Brain Behav Immun (United States: 2011 Elsevier Inc), pp. 1187-1196.

Francke, U., and Foellmer, B.E. (1989). The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32 [corrected]. Genomics *4*, 610-612.

Fuse, S., Bellfy, S., Yagita, H., and Usherwood, E.J. (2007). CD8+ T cell dysfunction and increase in murine gammaherpesvirus latent viral burden in the absence of 4-1BB ligand. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *178*, 5227-5236.

Galili, U. (1983). Glucocorticoid induced cytolysis of human normal and malignant lymphocytes. Journal of steroid biochemistry *19*, 483-490.

Gascoigne, N.R. (2008). Do T cells need endogenous peptides for activation? Nat Rev Immunol *8*, 895-900.

Gebhardt, T., and Mackay, L.K. (2012). Local immunity by tissue-resident CD8(+) memory T cells. Front Immunol *3*, 340.

Gebhardt, T., Wakim, L.M., Eidsmo, L., Reading, P.C., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. Nat Immunol *10*, 524-530.

Geginat, J., Paroni, M., Facciotti, F., Gruarin, P., Kastirr, I., Caprioli, F., Pagani, M., and Abrignani, S. (2013). The CD4-centered universe of human T cell subsets. Seminars in immunology *25*, 252-262.

Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. Nature reviews. Immunology *2*, 309-322.

Ginsberg, H.S. (1971). Immune states in long-term space flights. Life Sci Space Res *9*, 1-9.

Glaser, R. (1999). The differential impact of training stress and final examination stress on herpesvirus latency at the United States Military Academy at West Point. Brain Behav. Immun. *13*, 240-251.

Glaser, R., Pearson, G.R., Bonneau, R.H., Esterling, B.A., Atkinson, C., and Kiecolt-Glaser, J.K. (1993). Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. Health Psychol *12*, 435-442.

Gmunder, F.K., Konstantinova, I., Cogoli, A., Lesnyak, A., Bogomolov, W., and Grachov, A.W. (1994). Cellular immunity in cosmonauts during long duration spaceflight on board the orbital MIR station. Aviat Space Environ Med *65*, 419-423.

Goldrath, A.W. (2002). Maintaining the status quo: T-cell homeostasis. Microbes Infect *4*, 539-545.

Gopalakrishnan, R., Genc, K.O., Rice, A.J., Lee, S.M., Evans, H.J., Maender, C.C., Ilaslan, H., and Cavanagh, P.R. (2010). Muscle volume, strength, endurance, and exercise loads during 6-month missions in space. Aviat Space Environ Med *81*, 91-102.

Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M., and et al. (1994). Cloning of a T cell

growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. Science *264*, 965-968.

Grayson, J.M., Weant, A.E., Holbrook, B.C., and Hildeman, D. (2006). Role of Bim in regulating CD8+ T-cell responses during chronic viral infection. Journal of virology *80*, 8627-8638.

Green, A.R., Andrews, H.R., Bennett, L.G., Clifford, E.T., Ing, H., Jonkmans, G., Lewis, B.J., Noulty, R.A., and Ough, E.A. (2005). Bubble detector characterization for space radiation. Acta Astronaut *56*, 949-960.

Greenwald, R.J., Oosterwegel, M.A., van der Woude, D., Kubal, A., Mandelbrot, D.A., Boussiotis, V.A., and Sharpe, A.H. (2002). CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. European journal of immunology *32*, 366-373.

Gridley, D.S., Dutta-Roy, R., Andres, M.L., Nelson, G.A., and Pecaut, M.J. (2006). Acute effects of iron-particle radiation on immunity. Part II: Leukocyte activation, cytokines and adhesion. Radiat Res *165*, 78-87.

Gridley, D.S., Slater, J.M., Luo-Owen, X., Rizvi, A., Chapes, S.K., Stodieck, L.S., Ferguson, V.L., and Pecaut, M.J. (2009). Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. J Appl Physiol *106*, 194-202.

Grimley, P.M., Dong, F., and Rui, H. (1999). Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. Cytokine & growth factor reviews *10*, 131-157.

Grove, D.S., Pishak, S.A., and Mastro, A.M. (1995). The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. Experimental cell research *219*, 102-109.

.

Hand, T.W., Cui, W., Jung, Y.W., Sefik, E., Joshi, N.S., Chandele, A., Liu, Y., and Kaech, S.M. (2010). Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 16601-16606.

Hara, T., Shitara, S., Imai, K., Miyachi, H., Kitano, S., Yao, H., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2012). Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *189*, 1577-1584.

Hargens, A.R., and Richardson, S. (2009). Cardiovascular adaptations, fluid shifts, and countermeasures related to space flight. Respiratory physiology & neurobiology *169 Suppl 1*, S30-33.

Harlin, H., Hwang, K.W., Palucki, D.A., Kim, O., Thompson, C.B., Boothby, M., and Alegre, M.L. (2002). CTLA-4 engagement regulates NF-kappaB activation in vivo. European journal of immunology *32*, 2095-2104.

Hauer, J., Puschner, S., Ramakrishnan, P., Simon, U., Bongers, M., Federle, C., and Engelmann, H. (2005). TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 2874-2879.

Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. J Exp Med *192*, 1391-1402.

Heidari, N., Miller, A.V., Hicks, M.A., Marking, C.B., and Harada, H. (2012). Glucocorticoid-mediated BIM induction and apoptosis are regulated by Runx2 and c-Jun in leukemia cells. Cell Death Dis *3*, e349.

Hench, P.S., Kendall, E.C., Slocumb, C.H., and Polley, H.F. (1949). Adrenocortical Hormone in Arthritis : Preliminary Report. Annals of the rheumatic diseases *8*, 97-104.

Hermann, G., Tovar, C.A., Beck, F.M., and Sheridan, J.F. (1994). Kinetics of glucocorticoid response to restraint stress and/or experimental influenza viral infection in two inbred strains of mice. J Neuroimmunol *49*, 25-33.

Hettmann, T., Opferman, J.T., Leiden, J.M., and Ashton-Rickardt, P.G. (2003). A critical role for NF-kappaB transcription factors in the development of CD8+ memory-phenotype T cells. Immunology letters *85*, 297-300.

Hill, J.M., Lukiw, W.J., Gebhardt, B.M., Higaki, S., Loutsch, J.M., Myles, M.E., Thompson, H.W., Kwon, B.S., Bazan, N.G., and Kaufman, H.E. (2001). Gene expression analyzed by microarrays in HSV-1 latent mouse trigeminal ganglion following heat stress. Virus genes *23*, 273-280.

Hofbauer, L.C., and Rauner, M. (2009). Minireview: live and let die: molecular effects of glucocorticoids on bone cells. Mol Endocrinol *23*, 1525-1531.

Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. Cell *76*, 17-27.

Horigome, A., Hirano, T., Oka, K., Takeuchi, H., Sakurai, E., Kozaki, K., Matsuno, N., Nagao, T., and Kozaki, M. (1997). Glucocorticoids and cyclosporine induce apoptosis in mitogen-activated human peripheral mononuclear cells. Immunopharmacology *37*, 87-94.

Horvath, C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. Trends in biochemical sciences *25*, 496-502.

Hu, X., Li, W.P., Meng, C., and Ivashkiv, L.B. (2003). Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *170*, 4833-4839.

Hurtado, J.C., Kim, Y.J., and Kwon, B.S. (1997). Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *158*, 2600-2609.

Ichii, H., Sakamoto, A., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T. (2004). Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *173*, 883-891.

Ihle, J.N., Nosaka, T., Thierfelder, W., Quelle, F.W., and Shimoda, K. (1997). Jaks and Stats in cytokine signaling. Stem cells (Dayton, Ohio) *15 Suppl 1*, 105-111; discussion 112.

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D.*, et al.* (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. Nature immunology *6*, 1236-1244.

Irwin, M., Daniels, M., Risch, S.C., Bloom, E., and Weiner, H. (1988). Plasma cortisol and natural killer cell activity during bereavement. Biol Psychiatry *24*, 173-178.

Iseki, R., Mukai, M., and Iwata, M. (1991). Regulation of T lymphocyte apoptosis. Signals for the antagonism between activation- and glucocorticoid-induced death. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *147*, 4286-4292.

Iwasaki, K., Levine, B.D., Zhang, R., Zuckerman, J.H., Pawelczyk, J.A., Diedrich, A., Ertl, A.C., Cox, J.F., Cooke, W.H., Giller, C.A., *et al.* (2007). Human cerebral autoregulation before, during and after spaceflight. The Journal of physiology *579*, 799-810.

Iwata, M., Hanaoka, S., and Sato, K. (1991). Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. Eur J Immunol *21*, 643-648.

James, F.O., Cermakian, N., and Boivin, D.B. (2007). Circadian rhythms of melatonin, cortisol, and clock gene expression during simulated night shift work. Sleep *30*, 1427-1436.

Jett, J.H., Martin, J.C., Saunders, G.C., Stewart, C.C., and Laboratory, L.A.N. (1984). Flow Cytometry for Health Monitoring in Space (Los Alamos National Laboratory).

Johnston, J.A., Bacon, C.M., Finbloom, D.S., Rees, R.C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J.R., Gupta, S., Chen, Y.Q., Giri, J.D., and et al. (1995). Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 8705-8709.

Jones, C. (2003). Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. Clinical microbiology reviews *16*, 79-95.

Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. Immunity *27*, 281-295.

Joshi, N.S., and Kaech, S.M. (2008). Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. J Immunol *180*, 1309-1315.

Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. Nat Immunol *4*, 1191-1198.

Karin, M., and Chang, L. (2001). AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. J Endocrinol *169*, 447-451.

Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D.R. (1998). DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. Molecular cell *1*, 543-551.

Kaur, I., Simons, E.R., Castro, V.A., Mark Ott, C., and Pierson, D.L. (2004). Changes in neutrophil functions in astronauts. Brain Behav Immun *18*, 443-450.

Kaur, I., Simons, E.R., Castro, V.A., Ott, C.M., and Pierson, D.L. (2005). Changes in monocyte functions of astronauts. Brain Behav Immun *19*, 547-554.

Kelly, J., Spolski, R., Imada, K., Bollenbacher, J., Lee, S., and Leonard, W.J. (2003). A role for Stat5 in CD8+ T cell homeostasis. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *170*, 210-217.

Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., *et al.* (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. The Journal of experimental medicine *191*, 771-780.

Khanna, K.M., Lepisto, A.J., Decman, V., and Hendricks, R.L. (2004). Immune control of herpes simplex virus during latency. Current opinion in immunology *16*, 463-469.

.
Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., and Kuby, J. (2007). Kuby immunology, 6th edn (New York: W.H. Freeman).
Knox, A.J., and Pang, L. (2002). Glucocorticoid and beta-adrenoceptor agonist interactions in asthma. Lancet *360*, 1265-1266.
Konstantinova, I.V., Rykova, M., Meshkov, D., Peres, C., Husson, D., and Schmitt, D.A. (1995). Natural killer cells after ALTAIR mission. Acta Astronaut *36*, 713-718.
Krukowski, K., Eddy, J., Kosik, K.L., Konley, T., Janusek, L.W., and Mathews, H.L. (2011). Glucocorticoid dysregulation of natural killer cell function through epigenetic modification. Brain Behav Immun *25*, 239-249.
Kruszewska, B., Felten, S.Y., and Moynihan, J.A. (1995). Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy in two strains of mice. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *155*, 4613-4620.
Kupfer, S.R., and Summers, W.C. (1990). Identification of a glucocorticoid-responsive element in Epstein-Barr virus. Journal of virology *64*, 1984-1990.
Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. Nature reviews. Immunology *3*, 801-812.
Langer, S.J., and Ostrowski, M.C. (1988). Negative regulation of transcription in vitro by a glucocorticoid response element is mediated by a trans-acting factor. Mol Cell Biol *8*, 3872-3881.
Laycock, K.A., Lee, S.F., Brady, R.H., and Pepose, J.S. (1991). Characterization of a murine model of recurrent herpes simplex viral keratitis induced by ultraviolet B radiation. Invest Ophthalmol Vis Sci *32*, 2741-2746.
Leach, C.S., Alfrey, C.P., Suki, W.N., Leonard, J.I., Rambaut, P.C., Inners, L.D., Smith, S.M., Lane, H.W., and Krauhs, J.M. (1996). Regulation of body fluid compartments during short-term spaceflight. J Appl Physiol (1985) *81*, 105-116.
Leach, C.S., Inners, L.D., and Charles, J.B. (1991). Changes in total body water during spaceflight. Journal of clinical pharmacology *31*, 1001-1006.
LeBlanc, A., Schneider, V., Shackelford, L., West, S., Oganov, V., Bakulin, A., and Voronin, L. (2000). Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions *1*, 157-160.
Lechner, J., Welte, T., and Doppler, W. (1997). Mechanism of interaction between the glucocorticoid receptor and Stat5: role of DNA-binding. Immunobiology *198*, 112-123.
Lee, E.H., Ding, W., Kulkarni, A.D., and Granstein, R.D. (2005). Tumor growth and immune function in mice during hind-limb unloading. Aviat Space Environ Med *76*, 536-540.
Leonard, W.J., and O'Shea, J.J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. Annual review of immunology *16*, 293-322.
Licato, L.L., and Grimm, E.A. (1999). Multiple interleukin-2 signaling pathways differentially regulated by microgravity. Immunopharmacology *44*, 273-279.
Lin, G.H., Snell, L.M., Wortzman, M.E., Clouthier, D.L., and Watts, T.H. (2013). GITR-Dependent Regulation of 4-1BB Expression: Implications for T Cell Memory and Anti-4-1BB-Induced Pathology. J Immunol *190*, 4627-4639.
Lin, J.X., Li, P., Liu, D., Jin, H.T., He, J., Ata Ur Rasheed, M., Rochman, Y., Wang, L., Cui, K., Liu, C.*, et al.* (2012). Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. Immunity *36*, 586-599.

Liu, T., Khanna, K.M., Chen, X., Fink, D.J., and Hendricks, R.L. (2000). CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. The Journal of experimental medicine *191*, 1459-1466.

Liu, X., Robinson, G.W., Gouilleux, F., Groner, B., and Hennighausen, L. (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 8831-8835.

Liu, Z., Yuan, X., Luo, Y., He, Y., Jiang, Y., Chen, Z.K., and Sun, E. (2009). Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. Cytokine *45*, 141-147.

Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. Immunity *9*, 669-676.

Lodolce, J.P., Burkett, P.R., Koka, R.M., Boone, D.L., and Ma, A. (2002). Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. Cytokine Growth Factor Rev *13*, 429-439.

Lord, J.D., McIntosh, B.C., Greenberg, P.D., and Nelson, B.H. (2000). The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. J Immunol *164*, 2533-2541.

Lowenberg, M., Verhaar, A.P., Bilderbeek, J., Marle, J., Buttgereit, F., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J., and Hommes, D.W. (2006). Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. EMBO Rep *7*, 1023-1029.

Madden, K.S. (2003). Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. Brain Behav Immun *17 Suppl 1*, S5-10.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrancois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. Science *291*, 2413-2417.

Matsumoto, A., Seki, Y., Kubo, M., Ohtsuka, S., Suzuki, A., Hayashi, I., Tsuji, K., Nakahata, T., Okabe, M., Yamada, S., and Yoshimura, A. (1999). Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. Mol Cell Biol *19*, 6396-6407.

Matusali, G., Arena, G., De Leo, A., Di Renzo, L., and Mattia, E. (2009). Inhibition of p38 MAP kinase pathway induces apoptosis and prevents Epstein Barr virus reactivation in Raji cells exposed to lytic cycle inducing compounds. Molecular cancer *8*, 18.

Matyszak, M.K., Citterio, S., Rescigno, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2000). Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. European journal of immunology *30*, 1233-1242.

Mazzucchelli, R., and Durum, S.K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. Nature reviews. Immunology *7*, 144-154.

McCarty, R., Eisen, G., and Bartholow, C.L. (1991). Plasma catecholamine responses to acute motion stress in laboratory rats. Physiology & behavior *49*, 653-656.

McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S., and Cassatella, M.A. (1998). Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. Blood *92*, 4828-4835.

McInnes, I.B., Leung, B.P., Sturrock, R.D., Field, M., and Liew, F.Y. (1997). Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. Nat Med *3*, 189-195.

Meehan, R., Whitson, P., and Sams, C. (1993). The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. J Leukoc Biol *54*, 236-244.

Mehta, S.K., Crucian, B.E., Stowe, R.P., Simpson, R.J., Ott, C.M., Sams, C.F., and Pierson, D.L. (2013). Reactivation of latent viruses is associated with increased plasma cytokines in astronauts. Cytokine *61*, 205-209.

Mehta, S.K., Stowe, R.P., Feiveson, A.H., Tyring, S.K., and Pierson, D.L. (2000). Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. J Infect Dis *182*, 1761-1764.

Meinke, A., Barahmand-Pour, F., Wohrl, S., Stoiber, D., and Decker, T. (1996). Activation of different Stat5 isoforms contributes to cell-type-restricted signaling in response to interferons. Mol Cell Biol *16*, 6937-6944.

Meshkov, D., and Rykova, M. (1995). The natural cytotoxicity in cosmonauts on board space stations. Acta Astronaut *36*, 719-726.

Meyer, T., Gustafsson, J.A., and Carlstedt-Duke, J. (1997a). Glucocorticoid-dependent transcriptional repression of the osteocalcin gene by competitive binding at the TATA box. DNA and cell biology *16*, 919-927.

Meyer, W.K., Reichenbach, P., Schindler, U., Soldaini, E., and Nabholz, M. (1997b). Interaction of STAT5 dimers on two low affinity binding sites mediates interleukin 2 (IL-2) stimulation of IL-2 receptor alpha gene transcription. J Biol Chem *272*, 31821-31828.

Minami, M., Kita, M., Yan, X.Q., Yamamoto, T., Iida, T., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Imanishi, J. (2002). Role of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in herpes simplex virus type 1 infection. J Interferon Cytokine Res *22*, 671-676.

Mocarski, E.S., and Grakoui, A. (2008). Persistent and Latent Viral Infection. In Encyclopedia of Virology (Third Edition), B.W.J. Mahy, and M.H.V.V. Regenmortel, eds. (Oxford: Academic Press), pp. 108-116.

Mookerjee, B.K., Chen, P.B., and Pauly, J.L. (1989). IL-2-induced polyclonal proliferation of human peripheral blood lymphocytes: functional and phenotypic characteristics of proliferating cells. Immunology *66*, 176-182.

.

Morris, H.C., Damon, M., Maule, J., Monaco, L.A., and Wainwright, N. (2012). Rapid culture-independent microbial analysis aboard the international space station (ISS) stage two: quantifying three microbial biomarkers. Astrobiology *12*, 830-840.

Morukov, B., Rykova, M., Antropova, E., Berendeeva, T., Ponomaryov, S., and Larina, I. (2011). T-cell immunity and cytokine production in cosmonauts after long-duration space flights. Acta Astronautica *68*, 739-746.

Moynihan, J.A., Callahan, T.A., Kelley, S.P., and Campbell, L.M. (1998). Adrenal hormone modulation of type 1 and type 2 cytokine production by spleen cells: dexamethasone and dehydroepiandrosterone suppress interleukin-2, interleukin-4, and interferon-gamma production in vitro. Cellular immunology *184*, 58-64.

Murdaca, G., Setti, M., Brenci, S., Fenoglio, D., Lantieri, P., Indiveri, F., and Puppo, F. (2003). Modifications of immunological and neuro-endocrine parameters induced by antiorthostatic bed-rest in human healthy volunteers. Minerva Med *94*, 363-378.

Murosaki, S., Inagaki-Ohara, K., Kusaka, H., Ikeda, H., and Yoshikai, Y. (1997). Apoptosis of intestinal intraepithelial lymphocytes induced by exogenous and endogenous glucocorticoids. Microbiol Immunol *41*, 139-148.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. Cell *88*, 355-365.

Nagy, Z.S., LeBaron, M.J., Ross, J.A., Mitra, A., Rui, H., and Kirken, R.A. (2009). STAT5 regulation of BCL10 parallels constitutive NFkappaB activation in lymphoid tumor cells. Mol Cancer *8*, 67.

Naka, T., Matsumoto, T., Narazaki, M., Fujimoto, M., Morita, Y., Ohsawa, Y., Saito, H., Nagasawa, T., Uchiyama, Y., and Kishimoto, T. (1998). Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 15577-15582.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K.*, et al.* (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. Nature *387*, 924-929.

Nakajima, H., Liu, X.W., Wynshaw-Boris, A., Rosenthal, L.A., Imada, K., Finbloom, D.S., Hennighausen, L., and Leonard, W.J. (1997). An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction. Immunity *7*, 691-701.

Napetschnig, J., and Wu, H. (2013). Molecular basis of NF-kappaB signaling. Annual review of biophysics *42*, 443-468.

Narazaki, M., Fujimoto, M., Matsumoto, T., Morita, Y., Saito, H., Kajita, T., Yoshizaki, K., Naka, T., and Kishimoto, T. (1998). Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 13130-13134.

Nicolaides, N.C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G.P., and Charmandari, E. (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. In Steroids (United States), pp. 1-12.

Nishikawa, H., Kato, T., Hirayama, M., Orito, Y., Sato, E., Harada, N., Gnjatic, S., Old, L.J., and Shiku, H. (2008). Regulatory T cell-resistant CD8+ T cells induced by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor signaling. Cancer Res *68*, 5948-5954.

Nocentini, G., Giunchi, L., Ronchetti, S., Krausz, L.T., Bartoli, A., Moraca, R., Migliorati, G., and Riccardi, C. (1997). A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 6216-6221.

Nocentini, G., and Riccardi, C. (2009). GITR: a modulator of immune response and inflammation. Adv Exp Med Biol *647*, 156-173.

Nocentini, G., Ronchetti, S., Petrillo, M.G., and Riccardi, C. (2012). Pharmacological modulation of GITRL/GITR system: therapeutic perspectives. Br J Pharmacol *165*, 2089-2099.

Northrop, J.P., Crabtree, G.R., and Mattila, P.S. (1992). Negative regulation of interleukin 2 transcription by the glucocorticoid receptor. The Journal of experimental medicine *175*, 1235-1245.

Novak, U., Mui, A., Miyajima, A., and Paradiso, L. (1996). Formation of STAT5-containing DNA binding complexes in response to colony-stimulating factor-1 and platelet-derived growth factor. J Biol Chem *271*, 18350-18354.

Oberbeck, R. (2006). Catecholamines: physiological immunomodulators during health and illness. Curr Med Chem *13*, 1979-1989.

Opferman, J.T., Ober, B.T., and Ashton-Rickardt, P.G. (1999). Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. Science *283*, 1745-1748.

Osborne, L.C., and Abraham, N. (2010). Regulation of memory T cells by gammac cytokines. Cytokine *50*, 105-113.

Padgett, D.A., Bailey, M.T., Sheridan, J.F., Editor-in-Chief: George FinkAssociate Editors:Bruce, M., Kloet, E.R.d., Robert, R., George, C., Andrew, S., Noel, R., Ian, C., and Giora FeuersteinA2 - Editor-in-Chief: George FinkAssociate Editors:Bruce McEwen, E.R.d.K.R.R.G.C.A.S.N.R.I.C.G.F. (2007). Herpesviruses. In Encyclopedia of Stress (Second Edition) (New York: Academic Press), pp. 305-311.

Penkert, R.R., and Kalejta, R.F. (2011). Tegument protein control of latent herpesvirus establishment and animation. Herpesviridae *2*, 3.

Pierson, D.L., Chidambaram, M., Heath, J.D., Mallary, L., Mishra, S.K., Sharma, B., and Weinstock, G.M. (1996). Epidemiology of Staphylococcus aureus during space flight. FEMS immunology and medical microbiology *16*, 273-281.

Pierson, D.L., Stowe, R.P., Phillips, T.M., Lugg, D.J., and Mehta, S.K. (2005). Epstein-Barr virus shedding by astronauts during space flight. Brain Behav Immun *19*, 235-242.

Ploner, C., Rainer, J., Niederegger, H., Eduardoff, M., Villunger, A., Geley, S., and Kofler, R. (2008). The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. Leukemia *22*, 370-377.

Potter, K.G., Ware, C.F., Editors-in-Chief: William, J.L., and Lane, M.D. (2004). Tumor Necrosis Factor Receptors. In Encyclopedia of Biological Chemistry (New York: Elsevier), pp. 277-283.

Preston, C.M., and Efstathiou, S. (2007). Molecular basis of HSV latency and reactivation. In Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge).

Pulle, G., Vidric, M., and Watts, T.H. (2006). IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. J Immunol *176*, 2739-2748.

Rahaus, M., Desloges, N., and Wolff, M.H. (2006). Varicella-zoster virus influences the activities of components and targets of the ERK signalling pathway. The Journal of general virology *87*, 749-758.

Rai, B., and Kaur, J. (2011). Salivary stress markers and psychological stress in simulated microgravity: 21 days in 6 degrees head-down tilt. J Oral Sci *53*, 103-107.

Rambal, A.A., Panaguiton, Z.L., Kramer, L., Grant, S., and Harada, H. (2009). MEK inhibitors potentiate dexamethasone lethality in acute lymphoblastic leukemia cells through the pro-apoptotic molecule BIM. Leukemia *23*, 1744-1754.

Ray, A., Hemady, Z., and Rocklin, R.E. (1987). Glucocorticoid-induced enhancement of IgE synthesis. New England and regional allergy proceedings *8*, 81-84.

Ray, A., and Prefontaine, K.E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 752-756.

Ray, A., Siegel, M.D., Prefontaine, K.E., and Ray, P. (1995). Anti-inflammation: direct physical association and functional antagonism between transcription factor NF-KB and the glucocorticoid receptor. Chest *107*, 139S.

Richards, D.F., Fernandez, M., Caulfield, J., and Hawrylowicz, C.M. (2000). Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. European journal of immunology *30*, 2344-2354.

Rocha-Viegas, L., Vicent, G.P., Barañao, J.L., Beato, M., and Pecci, A. (2006). Glucocorticoids repress bcl-X expression in lymphoid cells by recruiting STAT5B to the P4 promoter. J Biol Chem *281*, 33959-33970.

Rochman, Y., Spolski, R., and Leonard, W.J. (2009). New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. Nature reviews. Immunology *9*, 480-490.

Ronchetti, S., Zollo, O., Bruscoli, S., Agostini, M., Bianchini, R., Nocentini, G., Ayroldi, E., and Riccardi, C. (2004). GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. Eur J Immunol *34*, 613-622.

Roumestan, C., Gougat, C., Jaffuel, D., and Mathieu, M. (2004). [Glucocorticoids and their receptor: mechanisms of action and clinical implications]. In La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne (France), pp. 636-647.

Rubinstein, M.P., Lind, N.A., Purton, J.F., Filippou, P., Best, J.A., McGhee, P.A., Surh, C.D., and Goldrath, A.W. (2008). IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. Blood *112*, 3704-3712.

Russell, M.S., Dudani, R., Krishnan, L., and Sad, S. (2009). IFN-gamma expressed by T cells regulates the persistence of antigen presentation by limiting the survival of dendritic cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *183*, 7710-7718.

Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K., and Kaech, S.M. (2009). Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. Immunity *31*, 296-308.

Rykova, M.P., Sonnenfeld, G., Lesnyak, A.T., Taylor, G.R., Meshkov, D.O., Mandel, A.D., Medvedev, A.E., Berry, W.D., Fuchs, B.B., and Konstantinova, I.V. (1992). Effect of spaceflight on natural killer cell activity. J Appl Physiol (1985) *73*, 196S-200S.

Sabbagh, L., Andreeva, D., Laramee, G.D., Oussa, N.A., Lew, D., Bisson, N., Soumounou, Y., Pawson, T., and Watts, T.H. (2013). Leukocyte-specific protein 1 links TNF receptor-associated factor 1 to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells. J Leukoc Biol *93*, 713-721.

Sabbagh, L., Pulle, G., Liu, Y., Tsitsikov, E.N., and Watts, T.H. (2008). ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of

CD8 T cell survival in vivo. In Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) (United States), pp. 8093-8101.

Sabbagh, L., Snell, L.M., and Watts, T.H. (2007). TNF family ligands define niches for T cell memory. In Trends Immunol (England), pp. 333-339.

Sabbagh, L., Srokowski, C.C., Pulle, G., Snell, L.M., Sedgmen, B.J., Liu, Y., Tsitsikov, E.N., and Watts, T.H. (2006). A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival. In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (United States), pp. 18703-18708.

Salicru, A.N., Sams, C.F., and Marshall, G.D. (2007). Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. Brain Behav Immun *21*, 913-920.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annu Rev Immunol *22*, 745-763.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature *401*, 708-712.

Sargsyan, A.E., Hamilton, D.R., Jones, J.A., Melton, S., Whitson, P.A., Kirkpatrick, A.W., Martin, D., and Dulchavsky, S.A. (2005). FAST at MACH 20: clinical ultrasound aboard the International Space Station. The Journal of trauma *58*, 35-39.

Sarid, O., Anson, O., Yaari, A., and Margalith, M. (2001). Epstein-Barr virus specific salivary antibodies as related to stress caused by examinations. J. Med. Virol. *64*, 149-156.

Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S., and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. The Journal of experimental medicine *205*, 625-640.

Sawtell, N.M., and Thompson, R.L. (1992). Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. J Virol *66*, 2150-2156.

Schaer, D.A., Murphy, J.T., and Wolchok, J.D. (2012). Modulation of GITR for cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol *24*, 217-224.

Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. Nature immunology *1*, 426-432.

Schluns, K.S., and Lefrancois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. Nature reviews. Immunology *3*, 269-279.

Schmitt, D.A., Schaffar, L., Taylor, G.R., Loftin, K.C., Schneider, V.S., Koebel, A., Abbal, M., Sonnenfeld, G., Lewis, D.E., Reuben, J.R., and Ferebee, R. (1996). Use of bed rest and head-down tilt to simulate spaceflight-induce immune system changes. J Interferon Cytokine Res *16*, 151-157.

Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., and Wagner, E.F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. Genes Dev *13*, 607-619.

Schuster, C., Chasserot-Golaz, S., Urier, G., Beck, G., and Sergeant, A. (1991). Evidence for a functional glucocorticoid responsive element in the Epstein-Barr virus genome. Mol Endocrinol *5*, 267-272.

Seckert, C.K., Griessl, M., Buttner, J.K., Scheller, S., Simon, C.O., Kropp, K.A., Renzaho, A., Kuhnapfel, B., Grzimek, N.K., and Reddehase, M.J. (2012). Viral latency drives 'memory inflation': a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. Med Microbiol Immunol *201*, 551-566.

Selye, H. (1975). Stress and distress. Comprehensive therapy *1*, 9-13.

Serova, L.V., and Denisova, L.A. (1982). The effect of weightlessness on the reproductive function of mammals. Physiologist *25*, S9-12.

Shanks, N., Zalcman, S., Zacharko, R.M., and Anisman, H. (1991). Alterations of central norepinephrine, dopamine and serotonin in several strains of mice following acute stressor exposure. Pharmacology, biochemistry, and behavior *38*, 69-75.

Shiku, H. (2003). Importance of CD4+ helper T-cells in antitumor immunity. International journal of hematology *77*, 435-438.

Shimano, M.M., and Volpon, J.B. (2007). Comportamento mecânico do terço proximal de fêmures de ratos após período de suspensão pela cauda e exercitação. Acta Ortopédica Brasileira *15*, 254-257.

Shimeld, C., Whiteland, J.L., Nicholls, S.M., Grinfeld, E., Easty, D.L., Gao, H., and Hill, T.J. (1995). Immune cell infiltration and persistence in the mouse trigeminal ganglion after infection of the cornea with herpes simplex virus type 1. Journal of neuroimmunology *61*, 7-16.

Siegel, A.M., Heimall, J., Freeman, A.F., Hsu, A.P., Brittain, E., Brenchley, J.M., Douek, D.C., Fahle, G.H., Cohen, J.I., Holland, S.M., and Milner, J.D. (2011). A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory. Immunity *35*, 806-818.

Sinclair, J., and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. The Journal of general virology *87*, 1763-1779.

Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S.*, et al.* (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. The Journal of cell biology *144*, 281-292.

Smith, S.M., Davis-Street, J.E., Fontenot, T.B., and Lane, H.W. (1997). Assessment of a portable clinical blood analyzer during space flight. Clinical chemistry *43*, 1056-1065.

Smith, S.M., Wastney, M.E., O'Brien, K.O., Morukov, B.V., Larina, I.M., Abrams, S.A., Davis-Street, J.E., Oganov, V., and Shackelford, L.C. (2005). Bone markers, calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the mir space station. J Bone Miner Res *20*, 208-218.

Smoak, K.A., and Cidlowski, J.A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. In Mech Ageing Dev (Ireland), pp. 697-706.

Snell, L.M., Lin, G.H., and Watts, T.H. (2012). IL-15-dependent upregulation of GITR on CD8 memory phenotype T cells in the bone marrow relative to spleen and lymph node suggests the bone marrow as a site of superior bioavailability of IL-15. In J Immunol (United States), pp. 5915-5923.

Snell, L.M., McPherson, A.J., Lin, G.H., Sakaguchi, S., Pandolfi, P.P., Riccardi, C., and Watts, T.H. (2010). CD8 T cell-intrinsic GITR is required for T cell clonal expansion and mouse survival following severe influenza infection. In J Immunol (United States), pp. 7223-7234.

Snow, J.W., Abraham, N., Ma, M.C., Abbey, N.W., Herndier, B., and Goldsmith, M.A. (2002). STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. Blood *99*, 95-101.

Snyder, C.M., Cho, K.S., Bonnett, E.L., Allan, J.E., and Hill, A.B. (2011). Sustained CD8+ T cell memory inflation after infection with a single-cycle cytomegalovirus. PLoS Pathog *7*, e1002295.

Sonnenfeld, G., Gould, C.L., Williams, J., and Mandel, A.D. (1988). Inhibited interferon production after space flight. Acta Microbiol Hung *35*, 411-416.

Stefanski, V., Peschel, A., and Reber, S. (2003). Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. Journal of neuroimmunology *138*, 17-24.

Stein, T.P. (2001). Nutrition in the space station era. Nutrition research reviews *14*, 87-118.

Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., and Nussenzweig, M. (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. Ann N Y Acad Sci *987*, 15-25.

Stone, K.P., Kastin, A.J., and Pan, W. (2011). NFkB is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. Cell Physiol Biochem *28*, 115-124.

Stowe, R.P., Kozlova, E.V., Sams, C.F., Pierson, D.L., and Walling, D.M. (2011a). Latent and lytic Epstein-Barr virus gene expression in the peripheral blood of astronauts. J Med Virol *83*, 1071-1077.

Stowe, R.P., Pierson, D.L., and Barrett, A.D. (2001). Elevated stress hormone levels relate to Epstein-Barr virus reactivation in astronauts. Psychosom Med *63*, 891-895.

Stowe, R.P., Pierson, D.L., Feeback, D.L., and Barrett, A.D. (2000). Stress-induced reactivation of Epstein-Barr virus in astronauts. Neuroimmunomodulation *8*, 51-58.

Stowe, R.P., Sams, C.F., and Pierson, D.L. (2003). Effects of mission duration on neuroimmune responses in astronauts. Aviat Space Environ Med *74*, 1281-1284.

Stowe, R.P., Sams, C.F., and Pierson, D.L. (2011b). Adrenocortical and immune responses following short- and long-duration spaceflight. Aviat Space Environ Med *82*, 627-634.

Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F.*, et al.* (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. The Journal of experimental medicine *202*, 673-685.

Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 8732-8737.

Tan, J.T., Ernst, B., Kieper, W.C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C.D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. The Journal of experimental medicine *195*, 1523-1532.

Tan, J.T., Whitmire, J.K., Ahmed, R., Pearson, T.C., and Larsen, C.P. (1999). 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *163*, 4859-4868.

Taylor, G.R., and Dardano, J.R. (1983). Human cellular immune responsiveness following space flight. Aviat Space Environ Med *54*, S55-59.

Taylor, G.R., and Janney, R.P. (1992). In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. J Leukoc Biol *51*, 129-132.

Theil, D., Derfuss, T., Paripovic, I., Herberger, S., Meinl, E., Schueler, O., Strupp, M., Arbusow, V., and Brandt, T. (2003). Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. The American journal of pathology *163*, 2179-2184.

Thiel, C.S., Paulsen, K., Bradacs, G., Lust, K., Tauber, S., Dumrese, C., Hilliger, A., Schoppmann, K., Biskup, J., Golz, N.*, et al.* (2012). Rapid alterations of cell cycle control proteins in human T lymphocytes in microgravity. Cell Commun Signal *10*, 1.

Thompson, E.B. (1998). The many roles of c-Myc in apoptosis. Annual review of physiology *60*, 575-600.

Tomiyama, H., Matsuda, T., and Takiguchi, M. (2002). Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *168*, 5538-5550.

Torti, N., and Oxenius, A. (2012). T cell memory in the context of persistent herpes viral infections. Viruses *4*, 1116-1143.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nature reviews. Immunology *2*, 735-747.

Trappe, S., Costill, D., Gallagher, P., Creer, A., Peters, J.R., Evans, H., Riley, D.A., and Fitts, R.H. (2009). Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. J Appl Physiol (1985) *106*, 1159-1168.

Traylen, C.M., Patel, H.R., Fondaw, W., Mahatme, S., Williams, J.F., Walker, L.R., Dyson, O.F., Arce, S., and Akula, S.M. (2011). Virus reactivation: a panoramic view in human infections. Future virology *6*, 451-463.

Uchakin, P.N., Cubbage, M.L., Sams, C.F., Morukov, B.V., Larina, I.V., and Bobrovnik, E.B. (1998). Effects of the 120 days of head-down bed rest on cytokine secretion and its in vitro modulation by glucocorticoids. J Gravit Physiol *5*, P171-172.

Uchakin, P.N., Stowe, R.P., Paddon-Jones, D., Tobin, B.W., Ferrando, A.A., and Wolfe, R.R. (2007). Cytokine secretion and latent herpes virus reactivation with 28 days of horizontal hypokinesia. Aviat Space Environ Med *78*, 608-612.

Uchakin, P.N., Tobin, B.W., Morukov, B.V., Larina, I.V., and Cubbage, M.L. (2002). Type 1 vs. type 2 cytokine secretion in vitro and its regulation by hydrocortisone in humans subjected to 120-day anti-orthostatic bed-rest regime. J Gravit Physiol *9*, 71-82.

Udden, M.M., Driscoll, T.B., Pickett, M.H., Leach-Huntoon, C.S., and Alfrey, C.P. (1995). Decreased production of red blood cells in human subjects exposed to microgravity. The Journal of laboratory and clinical medicine *125*, 442-449.

Uzzaman, A., and Cho, S.H. (2012). Chapter 28: Classification of hypersensitivity reactions. Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies *33 Suppl 1*, S96-99.

Vacca, A., Felli, M.P., Farina, A.R., Martinotti, S., Maroder, M., Screpanti, I., Meco, D., Petrangeli, E., Frati, L., and Gulino, A. (1992). Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. The Journal of experimental medicine *175*, 637-646.

Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Goldman, M., and Willems, F. (1999). Inhibition of human dendritic cell functions by methylprednisolone. Transplantation *67*, 1342-1347.

Vella, A.T., Dow, S., Potter, T.A., Kappler, J., and Marrack, P. (1998). Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 3810-3815.

Verbist, K.C., and Klonowski, K.D. (2012). Functions of IL-15 in anti-viral immunity: multiplicity and variety. Cytokine *59*, 467-478.

Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. Nature reviews. Immunology *7*, 543-555.

Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (1998). Role of 4-1BB in immune responses. Seminars in immunology *10*, 481-489.

Waldmann, T.A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. Nature reviews. Immunology *6*, 595-601.

Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (1999). The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. Annual review of immunology *17*, 19-49.

Wang, S., and El-Deiry, W.S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. Oncogene *22*, 8628-8633.

Wang, Y., Zhang, P., Liu, Y., and Cheng, G. (2010). TRAF-mediated regulation of immune and inflammatory responses. Science China. Life sciences *53*, 159-168.

Watts, T.H. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. Annu Rev Immunol *23*, 23-68.

Weant, A.E., Michalek, R.D., Khan, I.U., Holbrook, B.C., Willingham, M.C., and Grayson, J.M. (2008). Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. Immunity *28*, 218-230.

Webster, J.I., Tonelli, L., and Sternberg, E.M. (2002). Neuroendocrine regulation of immunity. Annu. Rev. Immunol. *20*, 125-163.

Webster Marketon, J.I., and Glaser, R. (2008). Stress hormones and immune function. Cellular immunology *252*, 16-26.

Wei, L.X., Zhou, J.N., Roberts, A.I., and Shi, Y.F. (2003). Lymphocyte reduction induced by hindlimb unloading: distinct mechanisms in the spleen and thymus. Cell Res *13*, 465-471.

Weninger, W., Crowley, M.A., Manjunath, N., and von Andrian, U.H. (2001). Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. The Journal of experimental medicine *194*, 953-966.

Wherry, E.J., Ha, S.J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. Immunity *27*, 670-684.

Wherry, E.J., Teichgraber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. Nature immunology *4*, 225-234.

Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F.W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. Immunity *3*, 521-530.

Williams, D., Kuipers, A., Mukai, C., and Thirsk, R. (2009). Acclimation during space flight: effects on human physiology. Cmaj *180*, 1317-1323.

Wira, C.R., Sandoe, C.P., and Steele, M.G. (1990). Glucocorticoid regulation of the humoral immune system. I. In vivo effects of dexamethasone on IgA and IgG in serum and at mucosal surfaces. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *144*, 142-146.

Wisdom, R. (1999). AP-1: one switch for many signals. Experimental cell research *253*, 180-185.

Wissink, S., van Heerde, E.C., Schmitz, M.L., Kalkhoven, E., van der Burg, B., Baeuerle, P.A., and van der Saag, P.T. (1997). Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. J Biol Chem *272*, 22278-22284.

Wojciechowski, S., Jordan, M.B., Zhu, Y., White, J., Zajac, A.J., and Hildeman, D.A. (2006). Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. European journal of immunology *36*, 1694-1706.

Wojciechowski, S., Tripathi, P., Bourdeau, T., Acero, L., Grimes, H.L., Katz, J.D., Finkelman, F.D., and Hildeman, D.A. (2007). Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis. The Journal of experimental medicine *204*, 1665-1675.

Woltman, A.M., de Fijter, J.W., Kamerling, S.W., Paul, L.C., Daha, M.R., and van Kooten, C. (2000). The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. European journal of immunology *30*, 1807-1812.

Woolf, E., Grigorova, I., Sagiv, A., Grabovsky, V., Feigelson, S.W., Shulman, Z., Hartmann, T., Sixt, M., Cyster, J.G., and Alon, R. (2007). Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. Nature immunology *8*, 1076-1085.

Xu, X., Tan, C., Li, P., Zhang, S., Pang, X., Liu, H., Li, L., Sun, X., Zhang, Y., Wu, H.*, et al.* (2013). Changes of Cytokines during a Spaceflight Analog - a 45-Day Head-Down Bed Rest. PLoS One *8*, e77401.

Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D.H., Pamer, E.G., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. (2002). Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *168*, 1198-1203.

Yang, E.V., Webster Marketon, J.I., Chen, M., Lo, K.W., Kim, S.J., and Glaser, R. (2010). Glucocorticoids activate Epstein Barr virus lytic replication through the upregulation of immediate early BZLF1 gene expression. In Brain Behav Immun (United States: 2010 Elsevier Inc), pp. 1089-1096.

Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J., and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. Cell *62*, 1205-1215.

Youinou, P., and Pers, J.O. (2010). The late news on baff in autoimmune diseases. Autoimmun Rev *9*, 804-806.

Young, L.S., Editors-in-Chief: , B.W.J.M., and Regenmortel, M.H.V.v. (2008). Epstein–Barr Virus: General Features. In Encyclopedia of Virology (Third Edition) (Oxford: Academic Press), pp. 148-157.

Yu, C.R., Young, H.A., and Ortaldo, J.R. (1998). Characterization of cytokine differential induction of STAT complexes in primary human T and NK cells. J Leukoc Biol *64*, 245-258.

Zhou, F., and Thompson, E.B. (1996). Role of c-jun induction in the glucocorticoid-evoked apoptotic pathway in human leukemic lymphoblasts. Mol Endocrinol *10*, 306-316.

Zhu, X.J., Shi, Y., Sun, J.Z., Shan, N.N., Peng, J., Guo, C.S., Qin, P., and Hou, M. (2009). High-dose dexamethasone inhibits BAFF expression in patients with immune thrombocytopenia. J Clin Immunol *29*, 603-610.

Zoukos, Y., Leonard, J.P., Thomaides, T., Thompson, A.J., and Cuzner, M.L. (1992). beta-Adrenergic receptor density and function of peripheral blood mononuclear cells are increased in multiple sclerosis: a regulatory role for cortisol and interleukin-1. Annals of neurology *31*, 657-662.