

Université de Montréal

Caractérisation des lymphocytes T CD4⁺CD8⁺ dans le contexte de la sclérose en plaques

Par
François Gagnon

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)
en Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Septembre, 2015

© François Gagnon, 2015

Résumé

Une petite population de lymphocytes T exprimant les deux corécepteurs CD4 et CD8 et appelée double positive (DP), a été détectée dans le sang périphérique de donneurs sains et de patients atteints de diverses pathologies dont la sclérose en plaques (SEP). Nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agissait de lymphocytes T hautement activés pouvant contribuer à l'inflammation chronique présente dans la SEP. Nous avons comparé les cellules T DP obtenues du sang de donneurs sains et de patients atteints de la SEP et non traités. La fréquence des cellules DP était similaire chez les patients et les donneurs sains. La proportion de lymphocytes T DP qui exprimaient les chaînes du récepteur de l'interleukine-15 (IL-15) était plus élevée que pour les autres populations lymphocytaires. Des mesures d'induction de la phosphorylation du STAT5 (*signal transducer and activator of transcription*) ont démontré que les cellules DP ont répondu à des doses plus faibles et pour de plus longues périodes à l'IL-15 comparativement aux autres lymphocytes T. Le pourcentage de lymphocytes T DP ayant la capacité de produire l'interféron-gamma et des enzymes lytiques était élevé chez les témoins sains mais ces niveaux étaient significativement réduits chez les patients atteints de la SEP. La caractérisation phénotypique de cellules DP a suggéré que ces cellules ont des propriétés similaires aux lymphocytes T activés. Bien qu'il ne s'agisse que d'une caractérisation partielle, il semble que les lymphocytes T DP perdent une partie de leurs propriétés chez les patients atteints de la SEP.

Mots clés : Sclérose en plaques, Lymphocytes T DP (CD4⁺CD8⁺), IL-15, STAT, Th1/Th2/Th17

Abstract

A small population of T lymphocytes expressing both CD4 and CD8 called double positive (DP) T lymphocytes has been detected in the peripheral blood of healthy donors and patients affected by different pathologies such as multiple sclerosis (MS). We hypothesize that these cells represent a highly activated T lymphocyte subset that could contribute to the characteristic inflammation found in MS. Thus, we compared DP T cells from healthy donors to those from untreated MS patients. We found similar frequencies of DP T lymphocytes between both groups. A higher percentage of DP T lymphocytes expressed the IL-15R (*interleukin 15 receptor*) than other T cell populations. Moreover, IL-15 triggered the phosphorylation of STAT5 in a greater proportion of CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes compared to other T cells. A greater percentage of CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes can produce interferon gamma and lytic enzymes compared with other T cell subsets. However, those levels were drastically lower in MS patients. The phenotypic characterization of the DP cells suggests they have similar properties as activated T cells. Even though the characterization process is still in its infancy, it appears that the DP T cells may lose some of their properties in MS patients.

Keywords : Multiple sclerosis, DP T lymphocytes (CD4⁺CD8⁺), IL-15, STAT, Th1/Th2/Th17

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
1.0 Le système immunitaire.....	2
2.0 Les lymphocytes T.....	3
2.1 Structure du récepteur du lymphocyte T.....	3
2.2 La sélection thymique.....	5
2.3 Les lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	8
2.4 Caractéristiques des lymphocytes T naïfs et mémoires	10
2.5 Les lymphocytes Th1/Tc1.....	11
2.6 Les lymphocytes Th2/Tc2.....	12
2.7 Les lymphocytes Th17/Tc17.....	12
2.8 Les lymphocytes T régulateurs	12
2.9 Les lymphocytes T folliculaires.....	14
2.10 Les Lymphocytes T CD4 ⁺ CD8 ⁺ doubles positifs	14
3.0 Signalisation cellulaire JAK-STAT	17
4.0 L'interleukine-15	21
4.1 La cytokine IL-15	21
4.2 Le récepteur de l'IL-15	22
4.3 Le rôle et les fonctions de l'IL-15.....	23

4.4 Les rôles de l'IL-15 dans des pathologies inflammatoires et auto-immunes.....	24
4.5 L'IL-15 et le système nerveux central	26
4.6 L'IL-15 et la sclérose en plaques	27
5.0 La sclérose en plaques	29
5.1 Les caractéristiques cliniques	30
5.2 Le diagnostic.....	31
5.3 La Barrière hémato-encéphalique et la SEP	32
5.4 Le rôle des lymphocytes T dans la SEP	33
5.4.1 Le rôle des lymphocytes T CD4 dans la SEP	33
5.4.2 Le rôle des lymphocytes T CD8 dans la SEP	35
5.4.3 Les lymphocytes T DP dans la SEP.....	37
5.5 Le rôle des lymphocytes B dans la SEP.....	38
5.6 Le rôle des cellules NK dans la SEP.....	39
5.7 Les thérapies contre la SEP.....	40
Hypothèse et objectifs.....	43
Hypothèse :	44
Objectifs :.....	44
Matériels et Méthodes.....	45
1.0 Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique humain.....	46
2.0 Étude fonctionnelle des cellules humaines	47
2.1 Stimulation cellulaire par l'IL-2 ou l'IL-15.....	47
2.2 Cytométrie en flux	47
Analyse statistique	49
Résultats.....	52
1.0 Identification de la population de lymphocytes T DP.	53
1.1 Optimisation de l'analyse multiparamétrique par cytométrie en flux des lymphocytes T DP.	53
1.2 Proportion des lymphocytes T DP parmi les lymphocytes T.	55
2.0 L'impact de l'IL-15 sur les lymphocytes T DP.	55

2.1 Expression des sous-unités du récepteur de l'IL-15 par les lymphocytes T.....	55
2.2 Cinétique de la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-15 et l'IL-2.	59
2.3 Dose-réponse de la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-15 et l'IL-2.....	63
3.0 Profil d'expression des lymphocytes T suite à une activation.....	65
3.1 Profil d'expression des cytokines signatures suite à une activation	65
3.1 Profil d'expression des enzymes lytiques suite à une activation	70
3.3 Expression de diverses cytokines par les lymphocytes T DP	70
4.0 Caractérisation phénotypique des lymphocytes T DP	72
4.1 Expression de récepteurs de chimiokines	72
4.2 Expression <i>ex-vivo</i> de CD57 et CD95 par les lymphocytes T	77
4.3 Expression <i>ex-vivo</i> de PD1 et de ses ligands par les lymphocytes T.....	80
4.4 Expression <i>ex-vivo</i> des récepteurs NKG2D, CCR6 et CD161 par les lymphocytes T ...	82
Discussion.....	85
Fréquence des lymphocytes T DP.....	86
Signature des cytokines et enzymes lytiques produites par les cellules T DP	87
Propriétés des cellules T CD4 et CD8 du sang de patients atteints de la SEP.....	90
Activité régulatrice des lymphocytes T DP	91
Caractérisation du phénotype de surface	91
Réponses à l'IL-15	95
Conclusion	98
Bibliographie.....	i
Figure supplémentaire.....	i

Liste des tableaux

Tableau I: Liste des anticorps/fluorochromes utilisés pour les analyses de cytométrie en flux	50
Tableau II: Liste des fluorochromes utilisés pour les analyses de cytométrie en flux	51
Tableau III: Liste des anticorps et méthodologie pour le marquage des STATs.....	51
Tableau IV : Composition de la banque de patients	53
Tableau V: Récapitulatif des analyses statistique de la cinétique d'IL-2 pour les DP vs. toutes les autres populations lymphocytaire.....	iii
Tableau VI: Récapitulatif des analyses statistique de la cinétique d'IL-15 pour les DP vs. toutes les autres populations lymphocytaire	iii
Tableau VII: Récapitulatif des analyses statistiques de la dose-réponse d'IL-2 pour les DP vs. toutes les autres populations lymphocytaires.....	iv
Tableau VIII: Récapitulatif des analyses statistiques de la dose-réponse d'IL-15 pour les DP vs. toutes les autres populations lymphocytaires	iv

Liste des figures

Figure 1: Le modèle de signalisation cinétique: un modèle non-classique du choix du sous-type cellulaire CD4/CD8.....	8
Figure 2: Schématisation de la polarisation des lymphocytes.	14
Figure 3: La voie JAK-STAT.	18
Figure 4: Schématisation de l'organisation structurelle des molécules Janus Kinases.	19
Figure 5: Présentation en <i>Trans</i> de l'IL-15.....	23
Figure 6: Les lymphocytes T CD4 ⁺ CD8 ⁺ doubles positifs représentent un sous-type lymphocytaire distinct.....	54
Figure 7: Expression <i>ex-vivo</i> des deux chaînes du récepteur de l'IL-15 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains.....	57
Figure 8: Expression <i>ex-vivo</i> des deux chaînes du récepteur de l'IL-15 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains.....	58
Figure 9: Détection de STAT5p sur les lymphocytes T.	61
Figure 10: Pourcentages de cellules T positives pour STAT5p suite à une cinétique.....	62
Figure 11: Pourcentages de cellules T positives pour STAT5p suite à une dose/réponse.....	64
Figure 12: Détection des cytokines signatures des sous-populations Th1/Tc1, Th2/Tc2 et Th17/Tc17.....	66
Figure 13: Détection des enzymes cytotoxiques.....	67
Figure 14: Caractérisation de l'expression de différentes cytokines et enzymes par les lymphocytes T.....	68
Figure 15: Cytokines produites par les lymphocytes T CD4 ⁺ CD8 ⁺	71
Figure 16: Expression <i>ex-vivo</i> des CCR7 et CXCR3 par les différentes sous-populations de lymphocytes T humains.	74
Figure 17: Expression <i>ex-vivo</i> de CCR7 par les différentes sous-populations de lymphocytes T humains.	75
Figure 18: Expression <i>ex-vivo</i> de CXCR3 par les différentes sous-populations de lymphocytes T humains.....	76

Figure 19: Expression *ex-vivo* des récepteurs CD57 ou CD95 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains. 79

Figure 20: Expression *ex-vivo* de PD1 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains. 81

Figure 21: Expression *ex-vivo* du récepteur NKG2D par différentes sous-populations de lymphocytes T humains. 83

Figure 22: Expression *ex-vivo* de CD161 et de CCR6 par les différentes sous-populations de lymphocytes T humains. 84

Figure 23: Expression *ex-vivo* de PD-L1 et PD-L2 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains. ii

Liste des abréviations

AA : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

Akt : protéine kinase B

ARNm : acide ribonucléique messenger

APs : arthrite psoriasique

ATP : adénosine-5'-triphosphate

Bcl-6 : *B-cell Lymphoma 6 protein*

BCR : récepteur de cellule B (*B cell receptor*)

BFA : *Brefeldin A from Penicillium Brefeldianum*

BHE : barrière hémato-encéphalique

CC : *Coiled-Coil*

CCR : récepteur C-C de chimiokine

CD : clusters de différenciation

CFSE : 5,6-carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène (*antigen presenting cell*)

Ctrl : contrôle

CTL : lymphocyte T cytotoxique (*cytotoxic T lymphocyte*)

CTLA-4 : *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*

DBD : domaine central de liaison à l'ADN

DC : cellule dendritique (*dendritic cell*)

DN : double négatif (CD4⁻CD8⁻)

DP : double positif (CD4⁺CD8⁺)

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EBV : virus d'Epstein-Barr

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

Facs : *fluorescence-activated cell sorting*

Fas : fragment inducteur d'apoptose (*apoptosis stimulating fragment*)

Foxp3 : *Forkhead boxp3*
FERM : *F for protein, E for ezrin, R for radixin and M for moesin*
FMO : fluorescence moins un fluorochrome (*fluorescence minus one*)
FSC-A : *forward-scattered light area*
FSC-W : *forward-scattered light width*
Fyn : *Proto-oncogene Tyrosine-protein kinase Fyn*
GA : acétate de glatiramère (*glatiramer acetate*)
GATA-3 : séquence d'ADN GATA reconnaissant le facteur de transcription 3
GM-CSF : *granulocyte macrophage colony stimulating factor*
HBSS : solution tamponnée de Hank (*Hank's balanced salt solution*)
HLA-DRB1 : antigène de leucocytes humain-DRB1
HLA-E : antigène de leucocytes humain E
HSC : cellule souche hématopoïétique (*hematopoietic stem cell*)
IELI : lymphocyte intra-épithélial-intestinal
IEL : lymphocyte intra-épithélial
IFN- β : interféron- β
IFN- γ : interféron- γ
ICOS : facteur inductible de costimulation (*inducible T-cell costimulation*)
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IL-15R : Récepteur de l'interleukine 15 (*interleukin 15 receptor*)
IRM : imagerie par résonance magnétique
ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*
iTreg : lymphocyte T régulateur inductible
JAK : Janus kinase
JH : domaine homologique JAK
JH1 : domaine tyrosine kinase 1
JH2 : domaine pseudo-kinase
JHMV : (*JHM strain of mouse hepatitis virus*)
LAT : *linker for the activation of T cells*
Lck : *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*

LCR : liquide céphalo-rachidien
LCS : liquide cérébrospinal
LFA-1 : (*lymphocyte function-associated antigen 1*)
LP : *Lamina Propria*
LPS : lipopolysaccharide
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MBP : protéine basique de la myéline
MMP-9 : métallo-protéase matricielle 9
MOG : glycoprotéine de la myéline des oligodendrocytes
MS : *multiple sclerosis*
NES : signal d'exportation nucléaire
NK : cellule naturelle tueuse (*natural killer cell*)
NKG2C : *Killer lectin-like receptor*
NKG2D : *Killer lectin-like receptor subfamily K, member 1*
NLS : signal de localisation nucléaire
Nrf2 : *nuclear factor (erythroid-derived)-like 2*
NT : région N terminal
nTreg : lymphocyte T régulateur naturel
OCBs : bandes oligoclonales (*oligoclonal bands*)
PAMP : patron moléculaire associé aux pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Pattern*)
pARNi : petit ARN interférent
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*)
PBS : solution tamponnée de phosphate (*phosphate buffer solution*)
PD-1 : protéine de la mort cellulaire programmée
PHA : phytohémagglutinine
PFA : tampon de paraformaldéhyde
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PMA : *Phorbol 12-myristate 13-acetate*
PMT : tube photomultiplicateur
PR : polyarthrite rhumatoïde
PRR : récepteurs de reconnaissance de patron (*Pattern Recognition Receptors*)

RAR : récepteur d'acide rétinoïque (*retinoic acid receptor*)
ROR γ : *RAR-related orphan receptors gamma*
RPM : révolution par minute
RPMI : *Roswell Park Memorial institute medium*
S1P : sphingosine-1-phosphate
Scr : *Proto-oncogene Tyrosine-protein kinase Src*
SEP : sclérose en plaques
SEB : entérotoxine B du Staphylocoque (*Staphylococcal enterotoxin*)
SH2 : *Src Homology 2 domain*
SIV : virus d'immunodéficience simienne
SNC : système nerveux central (*CNS*)
SOCS1 : *suppressor of cytokine signaling 1*
SP : simple positif
SPL-76 : (*Src homology 2 (SH2)-domain-containing-leukocytes-phosphoprotein*)
STAT : *signal transducer and activator of transcription*
SSC-A : *side-scattered light area*
Syk : *Spleen tyrosine kinase*
TAD : domaine de transactivation
Tc : lymphocyte T cytotoxique (CD8⁺)
TCR : récepteur du lymphocyte T (*T cell receptor*)
Tcm : T mémoire central
Tem : T effecteur mémoire
Thf : lymphocyte T folliculaire
TGF- β : *transformation growth factor- β*
Th : lymphocyte T auxiliaire (CD4⁺) (*T helper cell*)
TIM : *T cell immunoglobulin mucin*
TLR : Toll-like receptors
TNF : facteur nécrosant tumoral (*tumor necrosis factor*)
TNFR : récepteur du TNF
TREC : cercle d'excision d'ADN du TCR (*TCR rearrangement excision circle*)
Treg : lymphocyte T régulateur

TYK2 : tyrosine kinase 2

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VLA4 : *very late antigen-4*

vs. : *versus*

ZAP-70 : *Zeta-chain-associated protein kinase 70*

Remerciements

Je dois sincèrement remercier ma directrice de maîtrise, Dre. Nathalie Arbour qui m'a confié une place dans son équipe. Elle m'a donné une grande liberté intellectuelle et elle a su me rattraper au passage dans mes élans les plus farfelus. Elle s'est toujours montrée disponible à discuter de sciences et d'autres sujets envers tous ses étudiants créant ainsi une atmosphère de travail très conviviale. Elle a su aussi incorporer en ses étudiants une motivation à toujours être très consciencieux dans leurs travaux et de bien comprendre chaque détail. J'aimerais particulièrement la remercier pour sa patience et pour s'être montrée très conciliante dans la rédaction plutôt laborieuse de mon mémoire.

Je veux aussi remercier Madame Diane Beauseigle (maman Diane) qui s'est toujours montrée disponible pour nous aider dans nos projets et sans qui, rien ne serait aussi simple.

Merci à Vincent Sénécal et Jonas Brandenburg d'avoir été mes partenaires de crimes lors de ma maîtrise. Merci à Camille Pittet pour les « pokes » d'épaules matinaux. Merci à Laurine Legroux à qui nous devons encore un piédestal digne de ce nom. Merci à Gabrielle Deblois et à Negar Farzam-Kia (you know it your fault somehow). Un merci à toute l'équipe du Dr Alexandre Prat avec qui j'ai eu de nombreuses interactions dont Dr Catherine Larochelle et Dre Cornelia Podjaski. Un merci particulier à Lyne Bourbonnière, Simone Terouz et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la banque de patients. Un merci aussi à tous ceux qui ont croisé mon chemin dont : Dr Steve Gendron, Dr Soufiane Ghannam, Janet Laganière, Aurore Dodelet-Devillers, Héloïse Schuhmacher, Marie-Laure Clenet, Ana Carmena Moratalla, Florent Lemaître en plus de ceux que je ne peux nommer ici.

Un merci à mes amis dont Philippe Laflamme, Simon Beaulieu et Alexis Laferrière ainsi qu'à ma famille pour leurs soutiens et les pauses qu'ils m'ont forcé à prendre dans ma vie cruellement mal organisée. Merci aussi au Dre Sahar Soltanieh et Dr. Dragon qui m'ont initié à la recherche lors de mon 1^{er} stage de laboratoire.

Un merci particulièrement important à Mademoiselle Rose Priscilla Dionne sans qui mon parcours aurait été bien différent et aurait manqué cruellement de folie. Je termine en

remerciant une dernière fois Diane, Priscilla et Vincent pour leurs efforts dans la correction de mon mémoire, un gros merci à vous tous.

Introduction

1.0 Le système immunitaire

L'évolution et la complexification des systèmes biologiques ont créé de nouveaux défis en ce qui a trait à la protection et à l'intégrité de ceux-ci. Que les éléments potentiellement pathogènes soient internes ou externes, un système de défense immunitaire complexe et efficace dans le but de se protéger de ces éléments a été développé au cours de l'évolution. Le système immunitaire peut être divisé en deux volets: l'immunité innée et l'immunité adaptative. Malgré cette division, une importante coopération entre les deux est nécessaire pour une protection optimale. L'immunité innée constitue la première ligne de défense; elle inclut des barrières physiques telles que la peau et les muqueuses qui limitent l'entrée d'agents externes ainsi que de nombreuses cellules et molécules. Plusieurs cellules expriment des récepteurs appelés PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) qui leur permettent de reconnaître des motifs moléculaires conservés des micro-organismes nommés PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) revue par (Janeway and Medzhitov 2002). La reconnaissance de PAMPs par des PRRs enclenche une cascade complexe de signalisation intracellulaire qui contribue à l'activation des réponses immunitaires. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA) qui incluent entre autres les macrophages et les cellules dendritiques sont particulièrement susceptibles à une telle activation suite à la reconnaissance d'un PAMP. Ces cellules ont une capacité phagocytaire ainsi que la machinerie intracellulaire requise pour la transformation et la présentation des antigènes ingérés via des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dans le but de stimuler une réponse du système immunitaire adaptatif.

Les lymphocytes T et B constituent les cellules majeures du système immunitaire adaptatif. Très brièvement, les lymphocytes B, suite à la reconnaissance d'un antigène via leur récepteur de cellule B (BCR), deviennent activés et peuvent produire de nombreuses cytokines en plus de se différencier en cellules productrices d'anticorps. Les lymphocytes T via leur récepteur T (TCR) reconnaissent un épitope lié à une molécule du CMH présent à la surface d'une CPA. L'interaction efficace avec une CPA et le complexe épitope-CMH et d'autres molécules d'activation permet l'activation du lymphocyte T; le lymphocyte T activé acquiert plusieurs nouvelles fonctions dont la production de cytokines. Le système immunitaire est

finement régulé afin de permettre une réponse puissante et efficace contre les pathogènes. Par contre, une simple modification de la régulation de celui-ci peut entraîner des conséquences majeures qui peuvent permettre l'apparition de cancers ou de maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques (SEP).

2.0 Les lymphocytes T

2.1 Structure du récepteur du lymphocyte T

Le TCR est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T composé de deux glycoprotéines formant un hétérodimère $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ stabilisé par la présence d'un pont disulfure. Il s'agit d'un récepteur clé dans la reconnaissance des antigènes et donc dans l'activation du système immunitaire adaptatif. Il doit donc pouvoir interagir avec une grande variété d'antigènes. La capacité du TCR à reconnaître différents antigènes provient du réarrangement possible des sections de son ADN (acide désoxyribonucléique) qui sont responsables de certaines régions spécifiques de ses chaînes α et β . Ce sont les régions multi géniques V, J, C, et D. De celles-ci, seulement la région D est absente des chaînes α et γ . Le TCR $\alpha\beta$ est présent sur 95% des lymphocytes T et module leur l'activation par sa capacité à reconnaître des peptides présentés par les CMH de classe I ou II (Castro et al. 2014). Les autres lymphocytes T restant qui expriment le TCR $\gamma\delta$ ne semblent pas reconnaître le complexe peptide-CMH, mais plutôt une série de ligands. Les courtes régions intracellulaires des TCR $\alpha\beta$ et des TCR $\gamma\delta$ ne sont pas suffisantes pour induire une signalisation intracellulaire. Pour ce faire, ils ont besoin de former un complexe TCR-CD3 revue par (Kuhns and Badgandi 2012). Le CD3 est formé d'un complexe moléculaire regroupé par les dimères: CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ et CD3 $\xi\xi$ tous regroupés autour du TCR. Ceux-ci ont sur leur portion cytoplasmique dix motifs ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) qui contribuent à la signalisation intracellulaire par les tyrosines kinases. Les tyrosines kinases sont des enzymes spécialisées dans le transfert d'un groupe phosphate d'un ATP (adénosine-5'-triphosphate) à une protéine. En effet, l'ITAM sert de substrat pour une phosphorylation par les kinases Scr (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) et/ou Fyn (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*) et devient, par la suite, un ligand pour le domaine SH2 (*Scr homology 2*) de la famille des

kinases Syk (*Spleen tyrosine kinase*) (ZAP-70) (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) qui sont ensuite recrutées dans la voie de signalisation. Le domaine SH2 est une région fonctionnelle conservée formant une structure tridimensionnelle permettant la jonction entre deux protéines par un résidu de tyrosine phosphorylé. Le ZAP-70, à l'aide de son domaine catalytique, active les protéines LAT (*Linker for the activation of T cells*) et SLP-76 (*Src homology 2 (SH2)-domain-containing-leukocytes-phosphoprotein*) qui supportent le recrutement de plusieurs autres molécules de signalisation intracellulaire et participent donc à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Le fait d'avoir dix motifs ITAMs dans le complexe de signalisation permettrait une gradation de la signalisation ainsi que de la réponse obtenue (Wang et al. 2010) et revue par (Guy and Vignali 2009, Kuhns and Badgandi 2012).

Bien que l'activation des lymphocytes T doive s'accomplir par un signal venant du complexe CD3-TCR, celui-ci peut être supporté par plusieurs corécepteurs. Parmi ces corécepteurs, notons les CD4 et CD8 dont le rôle principal est le recrutement de la tyrosine kinase Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) au complexe TCR-pCMH par leur queue cytoplasmique qui favorise la phosphorylation des motifs ITAMs situés sur les sous-unités du CD3 (ϵ , γ , δ et ζ) (Artyomov et al. 2010, Rangarajan and Mariuzza 2014).

Le CD4 est une glycoprotéine monomérique composée de quatre domaines extracellulaires de type immunoglobuline et connectée par un domaine transmembranaire à une courte queue cytoplasmique pouvant s'attacher à la kinase: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck) qui est cruciale pour la signalisation des lymphocytes T. Au niveau structurel, le CD4 lie par son domaine D2 le CMH de classe II aux domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$. Quant au CD8, il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire dimérique retrouvée en conformation $\alpha\alpha$ ou $\alpha\beta$. La présence d'un CD8 $\beta\beta$ a aussi été rapportée, mais son rôle reste inconnu (Devine et al. 2000). L'expression de CD8 $\alpha\alpha$ est majoritairement observée sur les lymphocytes T $\gamma\delta$, les cellules T intra-épithéliale-intestinales (IELI) et les cellules naturelles tueuses (NK) alors que l'expression de CD8 $\alpha\beta$ est plutôt observée sur les thymocytes et les lymphocytes T cytotoxiques (Tc). La signalisation du TCR passe par le recrutement des Lck par la chaîne CD8 α présente dans le CD8 $\alpha\beta$ et CD8 $\alpha\alpha$. Le CMH de classe I, ligand des CD8 est retrouvé

sur la majorité des cellules nucléées (Artyomov et al. 2010, Li et al. 2013, Rangarajan and Mariuzza 2014).

Ils existent de nombreuses molécules en plus des glycoprotéines CD4 et CD8 qui viennent stabiliser/moduler la transduction du signal et peuvent donc, modifier l'activation et la réponse finale des lymphocytes T. Classifiés par leur structures, ceux-ci peuvent être divisés en quatre groupes : (1) les membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig) (e.g. CD28); (2) les membres de la famille du récepteur du facteur de la nécrose tumorale (TNFR) (e.g. CD40); (3) les molécules d'adhérence cellulaires ou intégrines (e.g. LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*)); (4) les membres de la famille des TIM (T cell immunoglobulin and mucin domain) revue par (Kinnear et al. 2013).

2.2 La sélection thymique

Le thymus, situé dans la cage thoracique au-dessus du cœur, se développe jusqu'à l'adolescence et par la suite, subit une dévolution progressive. Histologiquement, le thymus peut être divisé en deux sous-compartiments : le cortex et la médulla revue par (Gordon and Manley 2011, Koch and Radtke 2011). Cet organe spécialisé fournit le microenvironnement essentiel au développement des lymphocytes T à partir des cellules progénitrices lymphoïdes, qui proviennent de la moelle osseuse. Anatomiquement, on dénombre quatre régions associées à une étape précise du processus de maturation thymique: la zone sous capsulaire, le cortex, la médulla et la jonction cortico-médullaire revue par (Singer et al. 2008).

Au début de leur maturation thymique, les cellules précurseurs aux lymphocytes sont regroupées sous l'appellation de doubles négatives (DN) et sont sous-divisées en quatre groupes de DN1 à DN4. Ces cellules sont identifiées par l'absence d'expression du CD4 et du CD8, mais par l'expression différentielle du CD25, du CD44 et du CD117 au cours des différents stades de DN. Les cellules DN1 ($CD44^+CD25^-CD117^+$) sont situées à la jonction cortico-médullaire avant de migrer vers la zone sous capsulaire pour recevoir des signaux de différenciation vers le stade DN2 ($CD44^+CD25^+CD117^+$). La réorganisation génétique des chaînes γ , δ et β du TCR débute au stade DN2, mais est complétée ultérieurement au stade DN3 ($CD44^-CD25^+$) (Livak et al. 1999). La sélection d'expression du TCR $\alpha\beta$ ou du TCR $\gamma\delta$ s'effectue aussi dans l'étape transitoire de DN2 à DN3, mais le réarrangement génétique des

chaines dans le but de créer un TCR fonctionnel se poursuit jusqu'au stade DN4 (Burtrum et al. 1996). Les cellules au stade DN4 acquièrent les corécepteurs CD4 et CD8 suivant un signal pré-TCR et deviennent doubles positives (DP, CD4⁺CD8⁺). Le réarrangement de la chaîne α du TCR s'effectue aussi lors du passage de DN à DP revue par (Yates 2014). Les cellules DN TCR $\alpha\beta$ positives subissent ensuite la sélection positive au sein du cortex thymique afin de valider leur capacité à reconnaître des peptides présentés par des molécules du CMH autologues qui sont exprimées par des cellules épithéliales lors d'interactions entre celles-ci durant leurs migrations. Les thymocytes ayant été sélectionnés à ce stade se dirigent ensuite vers la médulla afin de subir la sélection négative où les cellules épithéliales médullaires et les cellules dendritiques leur présentent à nouveau des peptides du soi. Seulement les thymocytes qui reconnaissent les peptides du soi présentés par des molécules du CMH de type I ou II avec une réactivité suffisamment faible se développent ensuite en une cellule simple positive (SP) qui exprime le CD4 ou le CD8, les autres sont éliminées. Ces cellules peuvent ensuite quitter le thymus et atteindre la circulation périphérique comme lymphocytes T naïfs. Il a été estimé qu'environ 5% des thymocytes DP atteignent ce stade de maturation revue par (Egerton et al. 1990, Singer et al. 2008, Yates 2014). En effet, la majeure partie de ceux-ci sont éliminés lors des différentes étapes de maturations. La mort de la cellule peut être le résultat d'un signal de survie trop faible causant la mort de celle-ci par négligence. Ce phénomène est accentué par une résistance accrue des thymocytes DP lors de la sélection thymique aux signaux classiques de survie lymphocytaire tels que l'IL-7 et d'une plus grande expression de SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1), un puissant inhibiteur intracellulaire de la transduction des signaux des cytokines revue par (Singer et al. 2008).

Les mécanismes par lesquels le TCR dicte la sélection d'expression du CD4 ou du CD8 ne sont pas encore complètement élucidés. Même si plusieurs modèles ont été proposés au cours des dernières décennies, le modèle de signalisation cinétique semble le mieux expliquer le choix de l'expression du CD4 ou CD8. Ce modèle propose que la détermination de l'expression du CD4 ou du CD8 est dépendante de la durée du signal engagé par le TCR et que des cytokines de la famille des récepteur gamma c, telle que l'interleukine-7 (IL-7), servent de senseurs qui détectent cette durée du signal du TCR (Brugnera et al. 2000, Singer 2002, Singer and Bosselut 2004). Plusieurs observations *in vivo* et *in vitro* indiquent que le

signal du TCR arrête la transcription du CD8, mais pas du CD4 durant la sélection positive. Ceci a lieu en dépit de la restriction du complexe TCR/CMH. Dans ce modèle, les conséquences de l'arrêt de la transcription du CD8 sont évaluées sur la signalisation du TCR de la cellule. Si la signalisation du TCR persiste en l'absence du CD8 la cellule se différenciera en CD4 SP, mais si la signalisation cesse, la cellule deviendra un CD8 SP. Ce modèle met en évidence que la sélection positive des lymphocytes T et le choix final d'expression du CD4 ou du CD8 est basé autour d'évènements séquentiels. Le signal de la sélection positive du TCR induit un arrêt de la transcription du CD8 qui mène les lymphocytes DP à une étape intermédiaire de $CD4^+CD8^-$. À ce stade, les cellules ne sont pas encore engagées dans un phénotype définitif (CD4 vs. CD8). Le point central du modèle est que la transcription des corécepteurs CD4 et CD8 est réversible et dépend des cytokines de la famille du récepteur commun γc tel que l'IL-7 qui ont comme rôle d'évaluer le signal du TCR. Les cytokines telles que l'IL-7 sont importantes pour la survie des cellules $CD4^+CD8^-$, car la réversibilité de la transcription des corécepteurs se produit seulement lorsqu'il n'y a plus de signal du TCR, une étape où les cellules devraient mourir, mais où l'IL-7 maintient la cellule en vie. L'IL-7 module aussi cette réversibilité par sa capacité à promouvoir la ré-initiation de la transcription de CD8 et l'arrêt de la transcription du CD4 (Brugnera et al. 2000, Yu et al. 2003).

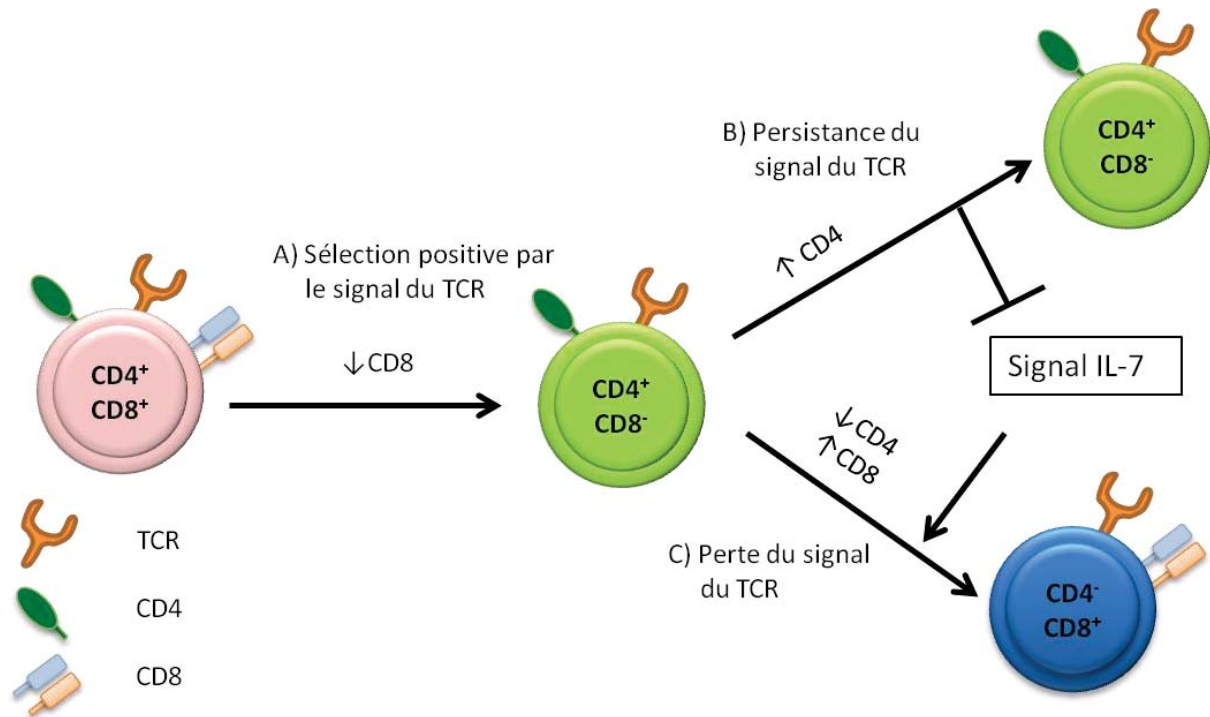


Figure 1: Le modèle de signalisation cinétique: un modèle non-classique du choix du sous-type cellulaire CD4/CD8.

A) Suivant l'expression simultanée des corécepteurs CD4 et CD8 durant la sélection thymique, les cellules diminuent leur transcription du corécepteur CD8. B) Si le signal du TCR persiste, la cellule deviendra une cellule CD4 simple positive. C) Au contraire, si le signal du TCR diminue, la cellule survivra grâce au signal provenant de l'IL-7 et inversera alors l'expression de CD4 et CD8 pour devenir une cellule CD8 simple positive. Adapté de la revue de (Singer et al. 2008).

2.3 Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺

Les lymphocytes T sont généralement divisés par leur expression du corécepteur CD4 ou CD8 associé à leur TCR. Ceci est reflété au niveau de leur appellation, c'est-à-dire lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Th) et lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Tc). Les lymphocytes Th sont des composants critiques du système immunitaire adaptatif et possèdent un rôle d'assistance et de support dans l'activation et la direction de nombreuses réponses immunitaires. Brièvement, les lymphocytes Th débutent leur activation lorsqu'ils

reconnaissent avec une affinité suffisante de leur TCR un peptide présenté par une molécule du CMH de classe II (signal 1) à la surface d'une CPA. Un deuxième signal est requis pour l'activation de ces cellules immunes et provient des molécules de co-stimulation (CD80 ou CD86) exprimées par le CPA qui sont reconnues par le récepteur CD28 à la surface des lymphocytes T (signal 2). Ce second signal est critique pour la génération de lymphocytes T effecteurs spécifiques à un antigène et à la génération de lymphocytes mémoires. Le troisième signal d'activation peut être considéré comme l'ensemble des signaux reçus par le lymphocyte T lui dictant sa différenciation finale (Th1/Th2/Th17), résultat dicté par les cytokines et les facteurs de croissance auxquels il est exposé revue par (Kolls 2013). La majorité des lymphocytes Th n'ont pas de capacité cytotoxique et phagocytaire directes; ils ne peuvent pas éliminer directement les pathogènes. Via leur interaction avec d'autres cellules du système immunitaire, ils peuvent par contre déclencher des cascades cellulaires menant à la neutralisation des agents infectieux.

Les lymphocytes Tc suivent un modèle d'activation similaire au Th à l'exception qu'ils réagissent à la présentation d'un peptide présenté par une molécule du CMH de classe I, donc le plus souvent, de nature endogène ou dans le contexte de présentation croisée. Une autre différence importante est leur capacité à détruire les cellules du soi exposant l'antigène cible. Ces lymphocytes expriment entre autres des ligands de Fas (fragment inducteur d'apoptose) (FasL) qui, lorsque liés au récepteur Fas sur les cellules cibles, induisent la voie de caspase et une mort apoptotique de ces cellules cibles. Ils peuvent aussi procéder par dégranulation permettant au complexe perforine/granzyme d'être relâché et de détruire les cellules infectées (Ou-Yang et al. 2012).

Selon le microenvironnement dans lequel évoluent les lymphocytes T naïfs lors de leur activation, ils peuvent se différencier en plusieurs sous-types cellulaires. L'exposition à des cytokines données et ultimement l'expression de facteurs de transcription cellulaire ainsi que leur propre production de cytokines en réponse au milieu engendrent différentes voies de développement menant à plusieurs sous-populations. Les cytokines sont des petites molécules produites pour la signalisation intercellulaire ayant de multiples fonctions. En examinant le profil d'expression de cytokines et les facteurs de transcription qui sont induits lors de l'activation, il est possible de séparer les lymphocytes T en plusieurs sous-populations telles

que les Th1/Tc1, Th2/Tc2 et Th17/Tc17. Un bref survol de ces sous-populations sera effectué dans une prochaine section.

2.4 Caractéristiques des lymphocytes T naïfs et mémoires

Caractéristique centrale de l'immunité adaptative, la mémoire immune permet, entre autres, de générer plus rapidement une réponse immunitaire lors d'une seconde exposition au même antigène (Amsen et al. 2013). Le tout débute lors de la réponse immunitaire primaire, lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît son antigène. Cette reconnaissance résulte en l'activation de celui-ci ainsi qu'à un processus d'expansion clonale et au développement de fonctions effectrices appropriées face à l'antigène en question. L'élimination et la diminution progressive de l'antigène seront suivies par une réduction de la population cellulaire effectrice par divers processus apoptotiques. Seulement un nombre réduit de cellules, en collaboration avec des signaux immunitaires spécifiques, survivront et deviendront la base de la mémoire immunologique. Il est important de noter qu'à travers ces événements, un équilibre homéostatique est maintenu d'autant plus qu'il s'agit de processus indépendants entre les cellules naïves et les cellules mémoires (Tanchot and Rocha 1998). De façon simpliste, les lymphocytes T naïfs sont renouvelés par des cellules fraîchement émigrées du thymus alors que le renouvellement des lymphocytes T mémoires dépend de l'activation de lymphocytes T naïfs et de leur maturation vers un phénotype mémoire, de leur maintien et de leurs réactivations lors d'une seconde exposition à un antigène donné. L'apport continu de lymphocytes naïfs du thymus ne doit pas entraver le développement et le maintien des cellules mémoires. De plus, l'expansion clonale massive résultant de l'activation des lymphocytes T naïfs ou de la réactivation des lymphocytes T effecteurs mémoires ne doivent pas nuire à l'arrivée de nouveaux lymphocytes naïfs (Bevan and Goldrath 2000).

La différenciation des lymphocytes naïfs et mémoires ainsi que notre capacité à identifier à quelles catégories les cellules étudiées appartiennent font toujours l'objet d'études importantes. Or, chez l'être humain, l'une des premières différences phénotypiques utilisées pour permettre la différenciation entre ces deux populations fut l'utilisation des isoformes de la protéine de surface CD45, une phosphatase incluse dans la signalisation cellulaire. Celle-ci est exprimée sous la forme CD45RA par les lymphocyte naïfs et sous la forme CD45RO sur

les lymphocytes mémoires (Mackay 1993). L'une des différences entre CD45RA et CD45RO réside dans la longueur de la protéine; l'isoforme CD45RO est le plus court, ce qui faciliterait l'activation subséquente de la cellule. Les notions d'identifications des lymphocytes naïfs et mémoires sur la base de l'expression des isoformes de CD45RA et CD45RO sont renforcées par la migration quasi exclusive des lymphocytes T naïfs (CD45RA) vers les tissus lymphoïdes et celle des lymphocytes T mémoires (CD45RO) vers la périphérie (Mackay 1993). La présence du CCR7, un récepteur de chimiokine ayant un rôle dans la migration cellulaire vers les tissus lymphoïdes secondaires, est aussi observée sur les lymphocytes T naïfs. Par ailleurs, ce récepteur permet de différencier deux sous-types de lymphocytes T mémoires; les lymphocytes T effecteurs mémoires (Tem) n'expriment pas ce récepteur alors que les lymphocytes T mémoires centraux (Tcm) l'expriment. Ces lymphocytes mémoires ont différents rôles dans l'immunité adaptative. En effet, les lymphocytes Tcm sont préférentiellement situés dans les organes lymphoïdes secondaires où, lorsqu'ils sont réexposés à leur antigène, peuvent proliférer et se différencier très efficacement entre autres en lymphocytes Tem revue par (Lanzavecchia and Sallusto 2000, Sallusto et al. 2004). Ces derniers sont responsables de l'immunité protectrice mémoire en migrant directement vers les sites d'inflammation et en possédant plusieurs fonctions effectrices telles qu'une production d'interféron- γ (IFN- γ), d'IL-4, d'IL-5 et/ou de perforine (Sallusto et al. 1999).

2.5 Les lymphocytes Th1/Tc1

Associés à l'immunité à médiation cellulaire, les lymphocytes Th1/Tc1 sont caractérisés par leur production d'IL-2, du facteur nécrosant tumoral (TNF) et d'IFN- γ . Leur polarisation est favorisée par la présence d'IL-12, d'IFN- γ ainsi que par l'activation des molécules de signalisation STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription*) et/ou STAT4. Ces dernières favorisent l'expression du facteur de transcription T-bet situé au cœur du fonctionnement et de la différenciation des Th1/Tc1. Par ailleurs, les lymphocytes Th1/Tc1 expriment préférentiellement les récepteurs des chimiokines CCR5 et CXCR3 (Abbas et al. 1996, Rengarajan et al. 2000, von Andrian and Mackay 2000). Ils contribuent aux réponses immunitaires dirigées contre des bactéries et des virus intracellulaires par l'activation des mécanismes cytotoxiques qu'ils supportent.

2.6 Les lymphocytes Th2/Tc2

Associés à l'immunité humorale, les lymphocytes Th2/Tc2 produisent plusieurs cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, et l'IL-13. Leur polarisation est induite par la présence d'IL-4 et par l'absence d'IL-12, par l'activation de STAT6 et du facteur de transcription GATA-3 (séquence d'ADN GATA reconnaissent le facteur de transcription 3). Ils expriment aussi les récepteurs de chimiokines CCR3 et CCR4 (Sad et al. 1995, Abbas et al. 1996, Rengarajan et al. 2000, Park et al. 2005). Ils ont un rôle dans l'élimination des parasites et pathogènes extracellulaires et participent à la suppression des activités pro-inflammatoires des cytokines sécrétées par les lymphocytes Th1/Tc1.

2.7 Les lymphocytes Th17/Tc17

Les lymphocytes Th17/Tc17 sécrètent de l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 ainsi que de l'IL-22. Leurs actions sont dirigées contre des pathogènes extracellulaires tels que les bactéries extracellulaires et les champignons. Ils expriment le récepteur de chimiokine CCR6. Pour les différencier des autres sous-populations, la co-expression de CCR4 et de CCR6 ou l'expression de CCR2 en l'absence de CCR5 peut être utilisée revue par (Miossec et al. 2009). Leur différenciation cellulaire nécessite le facteur de croissance de transformation (TGF- β) (transformation growth factor- β) en combinaison avec l'IL-6 ou l'IL-21 ainsi que le facteur de transcription ROR γ (*RAR-related orphan receptors gamma*). Ceci induit l'expression du récepteur à l'IL-23 qui permet de terminer sa différenciation en Th17, sa survie ainsi que son expansion (McGeachy et al. 2009). De plus, ils auraient un rôle dans des maladies inflammatoires et auto-immunes revue par (Miossec et al. 2009, Noack and Miossec 2014).

2.8 Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont un sous-type de lymphocytes T ayant un rôle dans la modulation du système immunitaire. Ils peuvent être subdivisés en deux sous-types généraux : les Treg induits en périphérie CD4⁺Foxp3⁺ (*Forkhead boxp3*) (iTreg) et les Treg naturels Foxp3⁺ (nTreg) originaires du thymus. Les deux sous-types peuvent être phénotypiquement et fonctionnellement distingués l'un de l'autre revue par (Chen and Kolls 2013). La différenciation des Treg dans le thymus est promue par une augmentation de

l'affinité dans l'interaction entre les peptides du soi et le CMH, alors que la différenciation des iTreg périphériques semble plutôt être due à une réponse à un antigène étranger (Jordan et al. 2001, Apostolou et al. 2002, Hsieh and Rudensky 2005, Kretschmer et al. 2005, Hsieh et al. 2006, Lathrop et al. 2011). Par ailleurs, une démonstration de la distinction de la réponse du TCR entre les nTreg et les iTreg a récemment été faite (Lathrop et al. 2011). De plus, malgré un nombre significatif de gènes partagés entre les iTreg et les nTreg, ceux-ci sont génétiquement distincts (Haribhai et al. 2009). La génération des iTreg dépend de la présentation antigénique des CPA ainsi que d'un microenvironnement riche en TGF- β et IL-2 (Kamphorst et al. 2010). La réduction de la réponse inflammatoire induite par les iTreg peut être bénéfique et/ou délétère selon le type et l'état de l'infection présente. Elles modulent la réponse immunitaire par une élimination des réponses cellulaires par des mécanismes contacts indépendants basés sur leur production de TGF- β , d'IL-10, d'IL-35 ainsi que d'autres facteurs immunosuppresseifs. Les nTreg modulent la réponse immunitaire par une élimination des réponses cellulaires via des mécanismes contact dépendants requérant le complexe granzyme B/perforine ou Fas/FasL. Ces cellules constituent une sous-population aux rôles majeurs dans la tolérance périphérique (Jonuleit et al. 2001) et revue par (Raimondi et al. 2007). Une déficience de leur nombre ou de leurs fonctions a été associée à plusieurs maladies à caractère auto-immunes revue par (Barbi et al. 2014). En effet, une diminution des lymphocytes Treg périphériques a été observé dans plusieurs pathologies dont l'arthrite juvénile idiopathique (Cao et al. 2004, de Kleer et al. 2004), l'arthrite psoriasique (Cao et al. 2004), l'association mixte de cryoglobulinémie et hépatite C (Boyer et al. 2004), la maladie auto immune du foie (Furuno et al. 2004), le lupus systémique érythémateux (Crispin et al. 2003, Liu et al. 2004), ainsi que la maladie de Kawasaki (Furuno et al. 2004). De plus, lorsqu'une diminution des Treg est observée, ceci correspond généralement à une activité pathologique plus élevée ou à un pronostic plus grave pour la pathologie en question (Crispin et al. 2003, Boyer et al. 2004, de Kleer et al. 2004, Furuno et al. 2004, Longhi et al. 2004). Par contre, une diminution des Treg circulant n'est pas observée dans certaines maladies à caractères auto immunitaires dont la SEP (Putheti et al. 2004, Viglietta et al. 2004).

2.9 Les lymphocytes T folliculaires

Les lymphocytes T folliculaires (Thf) sont localisés dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules modulent l'activation des lymphocytes B par leur expression de CD40L et la production d'IL-21. Le développement de cette population est sous le contrôle du facteur de transcription Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6 protein*) et est régulé par les facteurs inductibles de costimulation (ICOS) revue par (Crotty 2011).

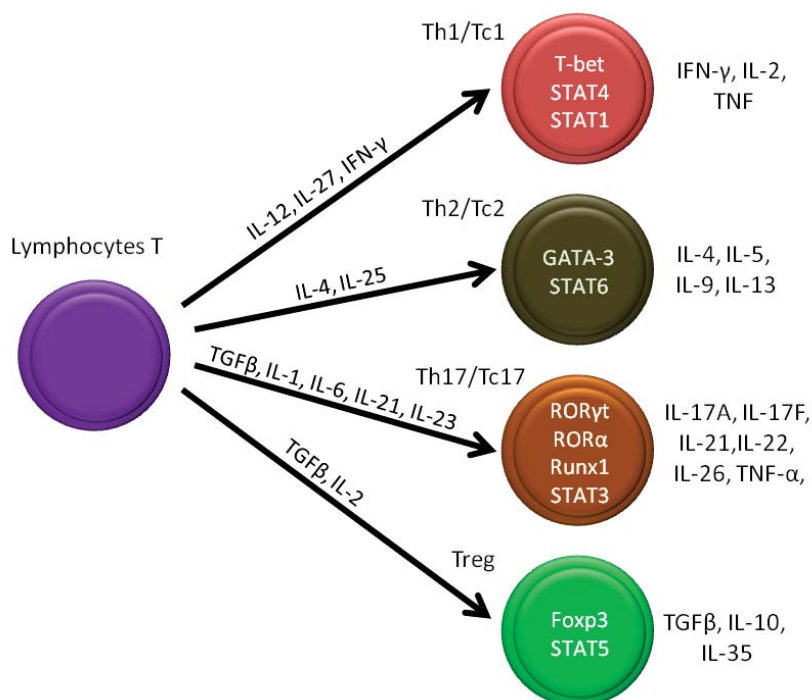


Figure 2: Schématisation de la polarisation des lymphocytes.

Adapté de la revue de (Kolls 2013).

2.10 Les Lymphocytes T CD4⁺CD8⁺ doubles positifs

L'existence des lymphocytes T CD4⁺CD8⁺ DP dans le sang périphérique a été rapportée il y a plus de 20 ans, représentant environ 1-2% des lymphocytes T en périphérie (Quandt et al. 2014). Il avait d'abord été proposé que l'expression des récepteurs CD4 et CD8, servant de pilier dans la définition des rôles auxiliaires ou cytotoxiques des cellules, était mutuellement exclusive et qu'une double expression était seulement possible dans les

processus de la sélection thymique. Par contre, plusieurs études ont rapporté l'existence de DP matures (Munschauer et al. 1993, Nascimbeni et al. 2004, Parel and Chizzolini 2004, Zloza and Al-Harhi 2006). De plus, une subdivision des populations de DP a depuis été avancée et fait toujours l'objet de nombreux travaux (Zloza and Al-Harhi 2006, Waschbisch et al. 2014) et revue par (Overgaard et al. 2015). La cytométrie en flux étant la technique utilisée pour étudier les DP, leurs sous-populations sont généralement divisées par rapport à la force du signal obtenue pour les marqueurs CD4 et CD8 ainsi que par la nature du corécepteur CD8 exprimé. La nomenclature généralement rencontrée fait état d'une population désignée comme CD4^{basse}CD8^{haute} lorsque les populations de CD8 expriment à nouveau le CD4 et de CD4^{haute}CD8^{basse} lors de la situation inverse. Par contre, notons aussi l'existence d'une population de CD4^{haute}CD8^{haute} (Zloza and Al-Harhi 2006). Seuls les DP CD4^{haut}CD8^{bas} possèdent une particularité au niveau de l'expression du CD8; il est exprimé sous la forme CD8 $\alpha\alpha$ contrairement au CD8 $\alpha\beta$ retrouvé chez les autres sous-populations revue par (Parel and Chizzolini 2004). Il est généralement accepté que les CD4^{haute}CD8^{basse} sont une sous-population de cellules T CD4 effectrices et hautement différenciés. Ceci est dû à l'analyse du TCR qui s'apparente à celui des lymphocytes T CD4 et non des lymphocytes T CD8 simples positifs ainsi qu'à l'expression $\alpha\alpha$ des CD8 revue par (Parel and Chizzolini 2004). La sensibilité et la véracité de la division des sous-populations des DP est jusqu'à présent très subjective étant donné l'absence d'un marqueur spécifique à cette et/ou à ces sous-populations de lymphocytes T.

Les lymphocytes T DP ont été décrits dans différents modèles animaux (Xie et al. 2009) en plus d'avoir été détectés chez des personnes saines (Sala et al. 1993, Prince et al. 1994, Tonutti et al. 1994, Colombatti et al. 1998) ainsi que dans le processus normal de vieillissement (Herndler-Brandstetter et al. 2007) dans la périphérie. Ils ont aussi été rapportés chez des individus atteints de leucémies des cellules B et T en périphérie et en tant qu'infiltrats au niveau de lésions spécifiques (Bagot et al. 1998, Mizuki et al. 1998), dans différentes pathologies à caractère auto-immunitaires telles que la myasthénie (Matsui et al. 1989), l'idiopathie thrombocytopénie (Mizutani et al. 1985), la SEP au niveau périphérique et dans le LCR mais absente des lésions du SNC (Munschauer et al. 1993, Waschbisch et al. 2014), la polyarthrite rhumatoïde (PR) en périphérie ainsi que dans les sites d'inflammations

synoviaux (De Maria et al. 1987, Quandt et al. 2014), la thyroïdite auto-immune (Iwatani et al. 1993) et enfin la sclérose systémique cutanée aux sites des lésions (Parel et al. 2007). Les lymphocytes T DP ont aussi été rapportés en périphérie dans la maladie de Parkinson (Hisanaga et al. 2001) et dans des contextes d'infections virales tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Kitchen et al. 2004, Frahm et al. 2012) et les virus des hépatites B et C avec des différences au niveau intra hépatique et périphérique (Nascimbeni et al. 2011). N'oublions d'ailleurs pas les cancers tels que les mélanomes (Desfrancois et al. 2010), le cancer du sein (Desfrancois et al. 2009), le syndrome de Sézary (Tournier et al. 2014) et de nombreux lymphomes associés à la présence de lymphocytes T DP (Wu et al. 2014) où ils ont été observés en tant qu'infiltra au niveau des mélanomes et des sites des lésions.

Il a été démontré qu'il est possible d'induire en culture des lymphocytes T DP en respectant certaines conditions spécifiques. En effet, lorsque des lymphocytes T CD4 sont isolés et activés en culture en présence d'IL-4, une expression de novo de CD8 $\alpha\alpha$ peut être détectée à leur surface. De plus, il s'agit d'une expression réversible puisque les lymphocytes T remis en culture en absence de l'IL-4, mais en présence d'IL-2 perdent l'expression du CD8. Cette expression permet aux lymphocytes de gagner des capacités cytotoxiques (Paliard et al. 1988, Brod et al. 1990). Lorsque les lymphocytes T CD8 sont stimulés in vitro par l'engagement de leur TCR et du CD28, l'induction de l'expression du CD4 par ces cellules est directement proportionnelle à la force de la co-stimulation utilisée (Kitchen et al. 2002). L'activation des lymphocytes T CD8 par des super antigènes tels que l'entérotoxine B du Staphylocoque (SEB) ou des mitogènes comme par exemple la phytohémagglutinine (PHA) a permis d'induire l'expression du CD4 sur des lymphocytes T CD8 (Sullivan et al. 2001).

Les lymphocytes T DP ne possèdent pas de marqueur de cellule ayant fraîchement émigré du thymus. Ces cellules ont moins de cercle d'excision d'ADN (TREC) ainsi que des télomères plus courts. Ces données semblent indiquer que les lymphocytes T DP ne sont pas des cellules ayant échappées ou quittées prématurément le thymus, mais qu'elles ont déjà subi des divisions cellulaires (Nascimbeni et al. 2004). Plusieurs études indiquent que les lymphocytes T DP sont des cellules hautement activées ayant un phénotype mémoire pouvant réagir plus efficacement à un antigène viral que des lymphocytes T simples positifs. De plus,

ces lymphocytes T ont des capacités cytotoxiques plus élevées que les lymphocytes T simples positifs. Ils ont aussi une capacité de dégranulation supérieure lorsque comparée aux lymphocytes T simples positifs (Nascimbeni et al. 2004, Nascimbeni et al. 2011).

Une certaine variation a été rapportée entre les différentes sous populations de lymphocytes T DP dans certaines conditions spécifiques (Hisanaga et al. 2001). L'une de celles-ci concerne les infections aux hépatites B et C où les patients infectés par le virus de l'hépatite B ont un niveau plus élevé de $CD4^{bas}CD8^{haut}$ et $CD4^{haut}CD8^{haut}$ alors que les patients atteints du virus de l'hépatite C ont plutôt un niveau plus élevé de $CD4^{haut}CD8^{bas}$ (Nascimbeni et al. 2011). Les populations de lymphocytes DP sont présentes en proportions plus importantes dans le foie, organe de prédilection de ces virus, que dans le sang de ces individus infectés. De plus, les lymphocytes T DP du foie ont un profil de marqueurs cellulaires plus hétérogènes que leurs équivalents dans le sang périphérique des mêmes donneurs infectés (Nascimbeni et al. 2011). Les lymphocytes T DP représentent une population hautement réactive chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui répondent indépendamment des compartiments traditionnels des lymphocytes T (Frahm et al. 2012). L'expression de CD4 sur les CD8 ($CD4^{bas}CD8^{haut}$) rend ces cellules susceptibles d'être infectées par le VIH ainsi que de répondre à l'IL-16 dont le récepteur est le CD4 revue par (Parel and Chizzolini 2004). Une étude effectuée sur des patients atteints de PR attribue aux lymphocytes T DP un rôle probable dans l'inflammation illustré par leur production plus élevée d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-21 ainsi que par leur présence dans le liquide synovial de ces patients (Quandt et al. 2014). Le groupe d'Overgaard et collègues ont depuis peu publié une excellente revue de littérature rassemblant les éléments ici abordés (Overgaard et al. 2015).

3.0 Signalisation cellulaire JAK-STAT

Les protéines Janus Kinases (JAKs) forment une famille regroupant quatre tyrosines kinases (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (Tyrosine Kinase 2)). Elles s'associent aux chaînes des récepteurs des cytokines et participent à la signalisation cellulaire par leur capacité de phosphorylation des résidus de tyrosines (figure 3a). Ceci inclut autant une phosphorylation de résidu tyrosine sur les chaînes des récepteurs que sur les protéines STATs. Les protéines STATs, une fois activées, ont la capacité de migrer vers le noyau dans le but de déclencher la

transcription de gènes. Chez les mammifères, il y a sept membres de la famille des STATs: STAT1-4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Bien que l'activation d'une même STAT puisse être effectuée par plusieurs cytokines, les STATs ont des fonctions biologiques essentielles et non redondantes (Aittomaki and Pesu 2014).

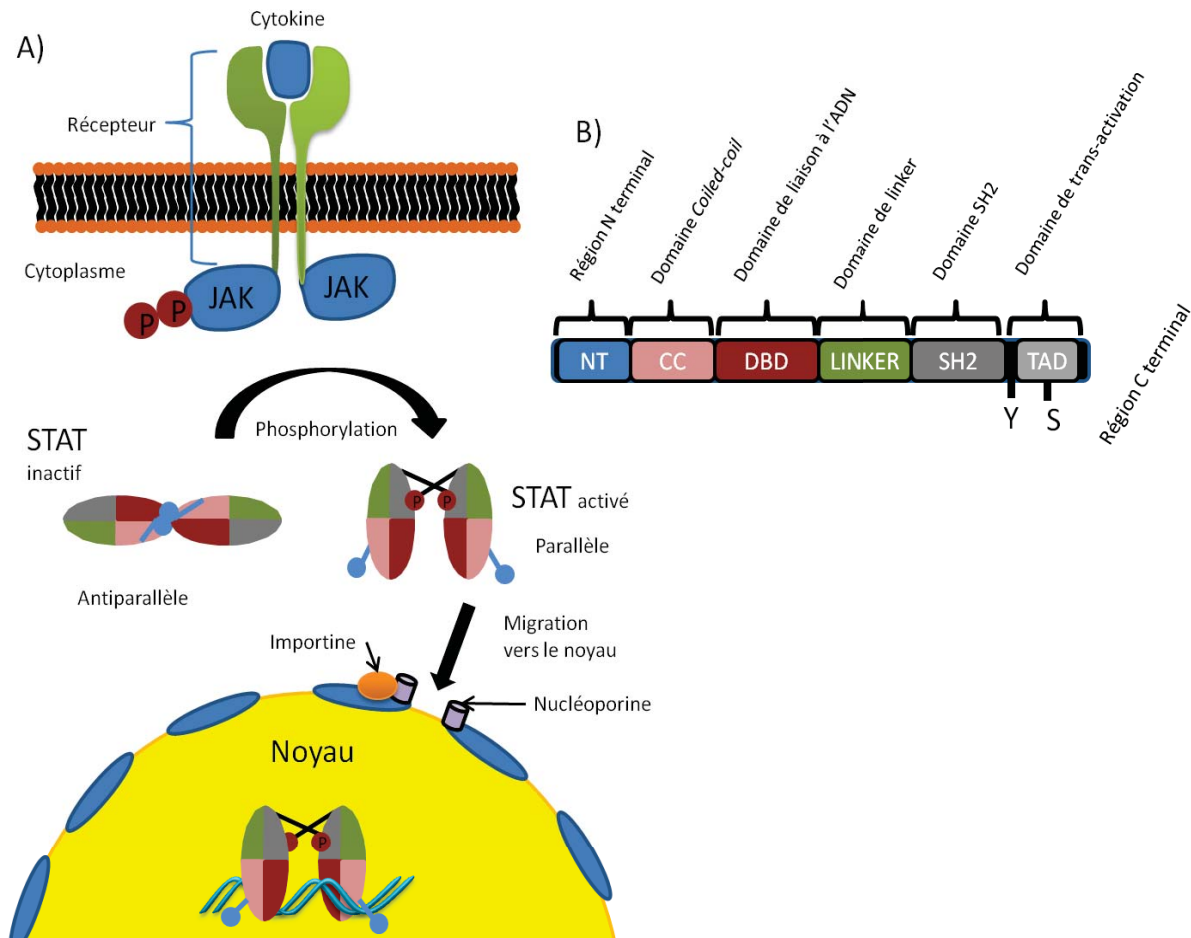


Figure 3: La voie JAK-STAT.

A) Représentation schématique de la cascade de signalisation JAK-STAT. L'activation du récepteur par la liaison de sa cytokine induit la phosphorylation des STATs par les protéines JAKs. Les STATs peuvent ensuite migrer vers le noyau et activer la transcription des gènes cibles. Adapté de revue de (Shuai and Liu 2003). B) Schématisation de la structure d'une molécule STAT. Facteur de transcription formé de six domaines, on retrouve suite à l'extrémité N-terminale un domaine (*coiled-coil*) suivi d'un domaine de liaison à l'ADN, d'une séquence de liaison, d'un domaine SH2 et d'un domaine de transactivation. Adapté de la revue de (Kiu and Nicholson 2012).

Les protéines JAK (figure 4) sont constituées de sept domaines conservés homologues appelés JH 1 à 7 (Harpur et al. 1992). Le domaine tyrosine kinase (JH1) situé en C-terminal est suivi d'un domaine pseudo-kinase (JH2) (Saharinen et al. 2000, Yeh et al. 2000, Saharinen et al. 2003) et d'un domaine similaire au SH2 (JH3 et une partie du JH4) (Bernards 1991, Kampa and Burnside 2000). Le domaine JH4 est entrecoupé dans les régions SH2 et FERM. La protéine se termine par une séquence ezrin, radixin, moesin ou FERM qui constitue les domaines JH5-7 situés en N terminal revue par (Yamaoka et al. 2004). L'image de cristallographie en haute résolution a permis d'obtenir la structure des quatre domaines actifs JAK (JH1) et montre une région hautement conservée et constituée d'un domaine kinase bilobé revue par (Lucet et al. 2006, Williams et al. 2009, Chrencik et al. 2010, Kiu and Nicholson 2012).

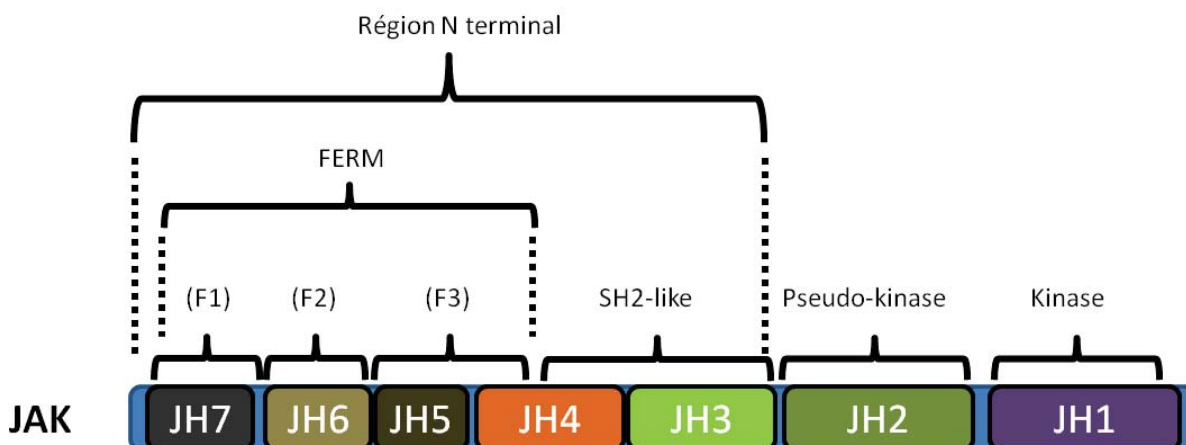


Figure 4: Schématisation de l'organisation structurale des molécules Janus Kinases.

Les protéines JAKs possèdent un domaine kinase en JH1 suivi d'un domaine pseudo-kinase en JH2. Un domaine SH2 est formé de JH3 et en partie de JH4. Le domaine FERM englobe une partie de JH4 jusqu'à JH7. Adapté de la revue de (Kiu and Nicholson 2012).

Chaque famille des protéines STATs est composée de sept motifs hautement conservés : un domaine terminal en N (NT), un domaine *Coiled-Coil* (CC), un domaine central de liaison à l'ADN (DBD), une région liante, un domaine SH2 suivi par un résidu tyrosine kinase et en son C-terminal un domaine de transactivation (TAD) (figure 3b). Lorsque les protéines ne sont pas activées, elles sont retrouvées sous la forme de dimères antiparallèles

formés par les interactions réciproques entre les régions N-terminal des STATs correspondant (Lackmann et al. 1998, Ndubuisi et al. 1999, Braunstein et al. 2003, Ota et al. 2004, Mao et al. 2005) et revue par (Kiu and Nicholson 2012). Lorsqu'un récepteur cellulaire est activé, deux ou plusieurs protéines JAKs associées aux récepteurs sont rapprochés par l'oligomérisation du récepteur. Ce rapprochement permet l'autophosphorylation et/ou la *trans* phosphorylation par des JAKs opposés. Par la suite, les protéines STATs, libres dans le cytoplasme, sont relocalisées à un site de liaison situé au niveau du récepteur formé par la phosphorylation de résidu de tyrosine par l'action des protéines JAKs préalablement activées revue par (Kiu and Nicholson 2012). Ceci est possible grâce à l'interaction de leur domaine SH2 au résidu phosphotyrosine du récepteur. Par la suite, les protéines JAKs attachées aux récepteurs phosphorylent les résidus tyrosine des protéines STATs. Ceci induit un réarrangement spatial du complexe dimérique des STATs vers une forme active qui est un dimère parallèle stabilisé par l'interaction réciproque des domaines SH2 et des phosphotyrosines entre deux protéines STATs. Ce dimère actif migre ensuite vers le noyau afin d'induire la transcription de gènes. Les STATs possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) sur lequel se lie des importines, qui agissent en tant que chaperonnes dans le transport actif des STATs vers le noyau (Melen et al. 2001, Fagerlund et al. 2002). Lorsque les STATs ne sont pas phosphorylés, le site du NLS n'est pas accessible aux importines ce qui rend la translocation vers le noyau impossible. Une fois dans le noyau, les dimères de STATs se lient à une séquence présente dans la région promotrice du gène cible. Lorsque les dimères de STATs se séparent de l'ADN, on pense qu'ils subiraient un changement de conformation de parallèle à antiparallèle. Ceci exposerait la phosphotyrosine en C-terminal des STATs pour les activités phosphatases subséquentes. La séparation du complexe STATs/ADN et la déphosphorylation du résidu tyrosine sont requises pour que les STATs puissent être exportées hors du noyau (Zhong et al. 2005, Mertens et al. 2006). Cette action requière également un signal d'exportation nucléaire (NES) et des facteurs d'exportations nucléaires. Ceci complète le cycle d'activation et de désactivation de la signalisation induite par les STATs revue par (Kiu and Nicholson 2012). Il est intéressant de noter que l'activation des STATs est un processus très rapide qui atteint son maximum en seulement 15-30 minutes suivant la stimulation des cellules du sang mononuclées (PBMC) et des lymphocytes T humains (Montag and Lotze 2006).

4.0 L'interleukine-15

4.1 La cytokine IL-15

L'IL-15 est une cytokine pléiotropique qui a été découverte simultanément par deux laboratoires en 1994 (Burton et al. 1994, Grabstein et al. 1994). Elle appartient à la famille des cytokines à quatre hélices alpha qui englobe aussi l'IL-2, IL-4, IL-7, l'IL-9 et l'IL-21 (Giri et al. 1995). Bien que l'expression d'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'IL-15 est très commune, l'expression de la protéine est hautement régulée revue par (Waldmann and Tagaya 1999) particulièrement au niveau post-transcriptionnel. Il existe en fait deux isoformes de l'ARNm de l'IL-15 qui ont une distribution intracellulaire, un transport, une sécrétion et une localisation endosomale différente montrant l'importance des signaux peptides dans les multiples mécanismes contrôlant la production d'IL-15 (Meazza et al. 1996, Onu et al. 1997, Tagaya et al. 1997, Gaggero et al. 1999, Kurys et al. 2000, Pereno et al. 2000). Les deux isoformes résultent par contre en une protéine mature identique de 114 acides aminés (aa). La différence réside dans la longueur des séquences signaux des précurseurs. Une chaîne terminale courte résulte en un entreposage intracellulaire de la cytokine et une chaîne longue à l'exportation de celle-ci (Gaggero et al. 1999, Kurys et al. 2000). De plus, la production très limitée de la protéine de l'IL-15 pourrait refléter la nécessité de contrôler la présence d'une cytokine ayant un grand potentiel pro-inflammatoire revue par (Verbist and Klonowski 2012).

L'IL-15 se lie avec une très haute affinité au récepteur IL-15R α avant son expression à la surface des cellules productrices telles les DC (Dubois et al. 2002). Les cellules productrices d'IL-15 produisant aussi l'IL-15R α peuvent transporter et présenter la cytokine à leur surface. Rapidement, l'expression de l'IL-15 peut être stimulée par la présence de plusieurs cytokines dont GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), d'ARNm à double brin, d'oligonucléotide CpG non méthylé, par la présence de lipopolysaccharide (LPS) grâce aux Toll-like receptors (TLR) ainsi que par certaines infections virales. La présentation du complexe IL-15/IL-15R α à la surface des cellules productrices est responsable de la majorité des effets in vivo de cette cytokine (McInnes and Gracie 2004, Huntington et al. 2011, Chertova et al. 2013). La coordination de la production et de la présentation de l'IL-15 par l'IL15R α par la même cellule est très importante pour la réponse des cellules T CD8

mémoires, des cellules NK et des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) (Burkett et al. 2004, Sandau et al. 2004, Schluns et al. 2004, Mortier et al. 2008). Malgré l'importance apparente de l'IL-15 pour le bon fonctionnement de ces cellules, virtuellement aucune cytokine libre n'est mesurée dans les liquides biologiques ou les surnageants des cellules activées qui expriment un niveau considérable d'ARNm pour celle-ci (Dubois et al. 2002). Elle est plutôt détectée sous une forme biologiquement active formant un complexe avec le récepteur IL-15R α étant donné la force de liaison entre la cytokine et le récepteur alpha (Bergamaschi et al. 2012). Ce complexe permet aussi à la cytokine de continuer son action bien après le retrait de l'IL-15 de l'environnement par un principe de recyclage de l'IL-15 qui la lie à la membrane plasmique des cellules. De plus, le complexe permet aussi une induction en *trans* à des cellules voisines à des concentrations de l'ordre de picomolaire (Dubois et al. 2002). L'affinité de l'IL-15R α peut être expliquée par la présence de deux sites de reconnaissance pour l'IL-15 en plus des nombreux complexes d'interaction ioniques entre ceux-ci (Giri et al. 1995, Bernard et al. 2004).

4.2 Le récepteur de l'IL-15

Le récepteur de l'IL-15 nécessaire à la transduction de signal est composé de deux sous-unités; l'IL-15R β /CD122 et la chaîne commune gamma c (γ c)/CD132. Celles-ci sont partagées avec le récepteur de l'IL-2 et sont essentielles à la transduction du signal des deux cytokines revue par (Waldmann et al. 1998, Waldmann and Tagaya 1999). La chaîne commune γ c est aussi partagée avec les autres membres de la famille des cytokines à quatre hélices alpha. De plus, de façon similaire à l'IL-2, IL-15 se lie et induit un signal par le complexe CD122/CD132 (Carson et al. 1994, Giri et al. 1994).

L'activation du récepteur (CD122/CD132) induit un signal intracellulaire passant par trois voies majeures: JAK/STAT, MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et PI3K (phosphoinositide-3-kinase)/Akt (protéine kinase B) (Hunt et al. 1999, Gu et al. 2000) et revue par (Leonard 2001). La chaîne CD122 active JAK1 qui induit la phosphorylation de STAT3, alors que la chaîne CD132 active JAK3 qui induit la phosphorylation de STAT5 (Miyazaki et al. 1994, Lin et al. 1995) et revue par (Mishra et al. 2014).

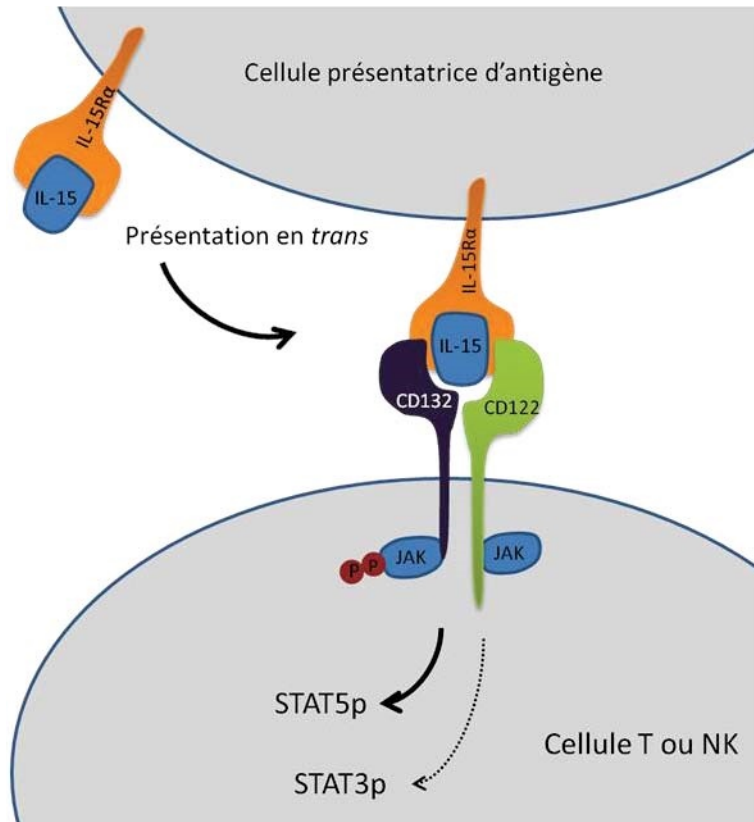


Figure 5: Présentation en *Trans* de l'IL-15.

L'IL-15 est liée au récepteur IL-15 α d'une CPA qui présente ensuite en *Trans* à une cellule adjacente à celle-ci. Le complexe IL-15/IL-15R α se lie par la suite avec le récepteur de l'IL-15 (CD132/CD122) qui active les voies de signalisation Jak-STAT. Adapté de la revue de (Zanoni et al. 2013).

4.3 Le rôle et les fonctions de l'IL-15

L'IL-15 possède plusieurs rôles biologiques dont l'induction de la différenciation et de la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK. Cette cytokine augmente les capacités cytotoxiques des lymphocytes T CD8 (Steel et al. 2012). L'ajout d'IL-15 aux lymphocytes T augmente l'expression de l'IL-2R α (CD25), du CD122 et de CD95 tout en réduisant l'expression de CD27 revue par (Waldmann and Tagaya 1999). Cette cytokine a aussi des propriétés de chimiotaxie sur les lymphocytes T, mais pas sur les lymphocytes B, les monocytes et les neutrophiles (Wilkinson and Liew 1995, McInnes et al. 1996). L'IL-15 favorise plusieurs phénomènes associés à la survie des lymphocytes B et T activés en agissant

entre autre, comme facteur de croissance et en inhibant certains mécanismes d'apoptose (Marks-Konczalik et al. 2000, Waldmann 2002) en plus de stimuler les cellules ayant un phénotype mémoire (Zhang et al. 1998). L'IL-15 favorise la différenciation et la synthèse d'immunoglobulines des lymphocytes B ainsi que la maturation des DC (Steel et al. 2012).

Plusieurs publications démontrent des fonctions divergentes de l'IL-15 au-delà du système immunitaire. Par contre, plusieurs de ces fonctions ainsi que les mécanismes y étant reliés sont encore mal compris. L'IL-15 aurait une implication physiologique dans l'angiogenèse (Angiolillo et al. 1997), dans l'hypertrophie musculaire squelettique (Quinn et al. 2002), dans la décidualisation endométriale (Verma et al. 2000), dans la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Stone et al. 2011) et dans la composition adipeuse de l'organisme (Alvarez et al. 2002).

4.4 Les rôles de l'IL-15 dans des pathologies inflammatoires et auto-immunes

Les cytokines sont des éléments cruciaux de la régulation immunitaire. La dérégulation d'une seule de celles-ci peut avoir des conséquences catastrophiques pour le maintien de l'homéostasie. La polyarthrite rhumatoïde, la maladie cœliaque, l'arthrite psoriasique, le lupus érythémateux disséminé, le diabète de type 1, l'ostéo-arthrite ainsi que des maladies inflammatoires chroniques intestinales sont tous des pathologies où l'IL-15 serait impliquée de près ou de loin dans les mécanismes pathologiques. Cette cytokine aurait aussi des rôles dans des maladies impliquant le système nerveux central.

La maladie cœliaque est une maladie inflammatoire et auto-immune intestinale qui survient suite à une exposition alimentaire au gluten; les réponses immunitaires innées et adaptatives contribuent aux dommages intestinaux. L'augmentation chronique de l'expression de l'IL-15 dans l'épithélium (Jabri et al. 2000, Mention et al. 2003) et dans la *Lamina propria* (LP) intestinale (Maiuri et al. 2000, Mention et al. 2003) sont des caractéristiques clés de la pathologie. De plus, l'expression de l'IL-15 est proportionnelle aux dommages observés dans les muqueuses (Di Sabatino et al. 2006). Cette surexpression diffère entre les patients à risque, les patients ayant un épisode actif de la maladie cœliaque et les patients ayant une diète

sans gluten. La surexpression répétitive de l'IL-15 dans la LP contribue à maintenir un réservoir de cellules effectrices et mémoires spécifiques au gluten qui peut augmenter le potentiel de développer la maladie. Malheureusement, les événements et les éléments menant à l'augmentation de l'expression de l'IL-15 sont encore inconnus revue par (Abadie and Jabri 2014). L'expression d'IL-15 et d'IL-15R α (ARN et protéine) est aussi plus élevée dans les tissus des muqueuses des patients atteints d'autres maladies inflammatoires intestinales, particulièrement ceux ayant des colites ulcéreuses (Nishiwaki et al. 2005). Une stimulation des cellules de la LP par le LPS ou l'IFN- γ résulte en une expression d'IL-15 qui n'est pas retrouvée chez les témoins. Les lymphocytes T de la LP sont plus sensibles à l'IL-15, particulièrement ceux des patients atteints de la maladie de Crohn (Liu et al. 2000). Dans la maladie de Crohn, la surexpression de l'IL-15 par les PBMCs et les tissus a été liée aux épisodes actifs de la maladie. Par contre, un rôle protecteur de l'IL-15 a aussi été avancé pour contrer la réponse Th1 exagérée dans la maladie de Crohn (Silva et al. 2005).

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique des jointures fortement associée à des mécanismes immuns avec une implication des lymphocytes T. Une élévation des niveaux de l'IL-15 dans le sérum et le liquide synovial des patients a été rapportée (McInnes et al. 1996, Petrovic-Rackov and Pejnovic 2006) ainsi que sa détection dans les fibroblastes synoviaux (Miranda-Carus et al. 2004). L'IL-15 est impliquée dans plusieurs aspects immunologiques en relation avec la PR (McInnes et al. 2003). Plus récemment, l'utilisation de petit ARN interférent (pARNi) contre la chaîne β du récepteur de l'IL-15, qui est aussi partagée avec l'IL-2, dans un modèle induit de PR chez le rat a exposé ce récepteur comme cible thérapeutique potentielle (Zhang et al. 2013).

L'arthrite psoriasique (APs) est une inflammation arthritique associée au psoriasis (Gladman et al. 2005). Une de ses caractéristiques est une élévation de l'IL-15 dans les tissus synoviaux affectés. Ceci a comme conséquence l'augmentation des capacités cytotoxiques des lymphocytes T CD8 et des cellules NK présentes, une condition reproduite lors de l'incubation des NK périphériques avec de l'IL-15 (Tang et al. 2013). Cette étude avance aussi que la destruction de tissus spécifiques ne se ferait pas via la reconnaissance d'un antigène du soi, mais par l'expression d'IL-15 et de ligands de stress cellulaires.

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune caractérisée par le dépôt de complexes immuns composés d'anticorps dirigés contre des antigènes du soi au sein de plusieurs organes et structures ayant des conséquences inflammatoires et nécrotiques (Mills 1994). Les échantillons de sérum des patients ont une concentration d'IL-15 plus élevée que les témoins (Park et al. 1999, Aringer et al. 2001, Baranda et al. 2005). Par contre, l'évaluation *in vitro* des lymphocytes des patients démontrent une activation déficiente face à la cytokine dont les résultats pointent vers un dysfonctionnement du récepteur ou des étapes de la transduction du signal (Baranda et al. 2005). Au niveau thérapeutique, une étude clinique concernant un inhibiteur de la signalisation cellulaire de l'IL-15 et qui a déjà été utilisé pour la PR est présentement en cours (Clark et al. 2013).

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune dans laquelle les cellules pancréatiques produisant l'insuline sont détruites par des lymphocytes T auto-réactifs revue par (Chen et al. 2013). Une exposition *in vitro* des îlots de Langerhans au virus de coxsackie ou à l'IFN- γ induit une augmentation de l'expression des gènes de l'IL-15 et de l'IL-15R α (Ylipaasto et al. 2005). Les niveaux de l'IL-15 et de l'IL-15R α sont plus élevés dans le sérum des patients atteints de diabète de type 1 comparativement à des témoins (Kuczynski et al. 2005, Chen et al. 2012). Une étude sur un modèle murin démontre l'importance de l'IL-15 dans l'activation initiale des lymphocytes T CD8 et des APC impliqués dans la pathologie et de son potentiel en tant que cible thérapeutique (Bobbala et al. 2012).

L'ostéoarthrite est une pathologie dégénérative des articulations qui résulte en une destruction du cartilage mou. La concentration d'IL-15 évolue avec la pathologie, mais est plus élevée au début de celle-ci (Scanzello et al. 2009). Il existe aussi une corrélation entre la concentration d'IL-15 dans le sérum et de la sensation de douleur ainsi que de la sévérité des lésions révélées par radiographie (Sun et al. 2013).

4.5 L'IL-15 et le système nerveux central

Les ARNm codant pour l'IL-15 et l'IL-15R α sont exprimés constitutivement dans plusieurs régions du SNC, l'expression est modifiée lors du développement chez la souris et l'humain (Hanisch et al. 1997, Kurowska et al. 2002). De plus, une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-15 a été rapportée dans différentes régions du SNC lors de

travaux *in vitro* portant sur le modèle de l'EAE (Wu et al. 2010). Toutefois, la disponibilité de la cytokine au niveau de la protéine n'est toujours pas connue. Par contre, son expression reste fortement contrôlée à de multiples niveaux ce qui signifie qu'un changement au niveau de l'ARNm ne se traduit pas automatiquement par une modification de la disponibilité de la protéine (Steel et al. 2012).

Plusieurs chercheurs ont tenté de déterminer s'il existe un lien entre l'IL-15 et le système nerveux central (SNC) en conditions pathologiques. Un modèle d'étude sur l'origine de la douleur neuropathique a révélé qu'une blessure du système nerveux périphérique entraîne une modulation de l'expression de l'IL-15 (ARNm et protéine) dans le SNC (Gomez-Nicola et al. 2008). Des travaux menés sur la maladie de Parkinson mettent en lumière les difficultés inhérentes à l'évaluation de la cytokine libre dans le sérum où seulement quelques pg/ml sont détectés (Gangemi et al. 2003, Rentzos et al. 2007). Une situation semblable est retrouvée dans les résultats portant sur la maladie de l'Alzheimer où l'IL-15 circulant dans le liquide céphalo-rachidien LCR est mesurée dans un ordre de grandeur similaire (Engelborghs et al. 1999, Gomez-Tortosa et al. 2003, Rentzos et al. 2006). Il est donc très difficile de tirer des conclusions sur le ou les rôles potentiels de l'IL-15. De plus, ces travaux reposent sur l'évaluation de la forme soluble de la cytokine alors que celle-ci est plutôt retrouvée liée au récepteur IL-15R α à la surface des cellules pouvant présenter la cytokine. Un retour sur ces pathologies en tenant compte de la biologie particulière de l'IL-15 pourrait s'avérer plus prometteur.

4.6 L'IL-15 et la sclérose en plaques

Chez les patients atteints de la sclérose en plaques (SEP) pathologie qui sera discutée plus en profondeur dans la prochaine section, les niveaux mesurés de l'IL-15 sont plus élevés dans le sérum et les PBMCs comparativement aux donneurs sains tant au niveau de l'ARNm que de la protéine (Kivisakk et al. 1998, Pashenkov et al. 1999, Blanco-Jerez et al. 2002, Vaknin-Dembinsky et al. 2008, Schneider et al. 2011). Au niveau du sérum, cette différence est plus prononcée chez les patients atteints de la forme progressive de la SEP même si des niveaux faibles ont aussi été rapportés (Kivisakk et al. 1998, Pashenkov et al. 1999). De plus, l'augmentation de l'ARNm est plutôt détectée chez les patients en rechute que chez les

patients stables (Blanco-Jerez et al. 2002) ainsi que dans les plaques actives (Baranzini et al. 2000). Ceci suggère que l'IL-15 pourrait être un facteur d'activation dans les réactions d'inflammation observées dans la SEP (Rentzos and Rombos 2012).

Par ailleurs, le complexe IL-15/IL-15R α est exprimé par une plus grande proportion de lymphocytes B (CD19) et de monocytes (CD14) chez les patients atteints de la SEP (Vaknin-Dembinsky et al. 2008, Schneider et al. 2011). Ces cellules représentent une source suffisante et fonctionnelle de la cytokine permettant d'augmenter la migration à travers la BHE et la capacité à éliminer les cellules gliales des lymphocytes T CD8 (Schneider et al. 2011). De plus, les lymphocytes T CD8 sont retrouvés en plus grand nombre près des sites de lésions de SEP contenant des cellules productrices d'IL-15 (Saikali et al. 2010).

L'IL-15 influence aussi la survie des lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoires ainsi que les cellules NK en plus de leur potentiel cytotoxique dans la SEP (Liu et al. 2007, Liu and Gao 2007, Chen and Freedman 2008, Correale and Villa 2008, Saikali et al. 2010). Plus récemment, l'étude *in vitro* de la cytokine a révélé qu'elle influence aussi d'autres populations cellulaires tels les lymphocytes T CD4⁺CD28⁻, une population cytotoxique et pro-inflammatoire, pouvant augmenter leur potentiel pathologique dans la maladie (Broux et al. 2015). L'IL-15 augmente aussi l'expression du NKG2D sur les lymphocytes T CD8 et les cellules NK (Zarogoulidis et al. 2014) dont l'interaction avec son ligand a été associé à une activité de cytotoxicité envers le SNC (Saikali et al. 2007). L'IL-15 cause une augmentation de l'expression de CXCR3, une molécule associée à la migration des cellules immunitaires vers la périphérie et le SNC (Williams et al. 2014). Dans la SEP ce récepteur est surexprimé et présent sur la majorité des lymphocytes T présents dans le LCR (Mazzi 2015). De plus, un des ses ligands (CXCL10) est fortement exprimé dans les lésions démyélinisantes du cerveau (Balashov et al. 1999).

Toutefois, il existe certains travaux qui mettent en lumière certaines caractéristiques conflictuelles de l'IL-15 dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), le modèle murin de la SEP, qui sera élaboré ultérieurement. Les lymphocytes T CD8 CD122⁺, sensibles à l'IL-15, seraient une sous-population de lymphocytes T CD8 bénéfiques dans l'EAE qui diminueraient la production d'IL-17 des Th17 (Yu et al. 2014). L'IL-15 serait aussi bénéfique pour les lymphocytes T CD8 CD38^{haute}, une petite population cellulaire qui

inhiberait les lymphocytes T CD4 effecteurs (Bahri et al. 2012). Les souris du modèle de l'EAE dont le gène codant pour l'IL-15 ou de son ligand ont été neutralisé ont une évolution plus sévère de la pathologie (Gomez-Nicola et al. 2010, Wu et al. 2010). Conséquemment, un traitement à l'IL-15 a été bénéfique aux symptômes locomoteurs de ces souris (Wu et al. 2010). Toutefois, la cohorte de souris utilisée (femelles SJL/J de deux mois, laboratoire Jackson, IL-15 KO C57BL/6NTac-IL-15^{tm1Imx}, Taconic et leurs contrôle C57BL/6NTac) n'a eu qu'une forme légère de l'EAE; l'aspect bénéfique avancé n'a donc été que très modeste. De plus, les souris déficientes pour l'IL-15 depuis la naissance ont un système immunitaire altéré; le nombre de plusieurs types de cellules immunitaires est fortement diminué (Kennedy et al. 2000, Koka et al. 2003). Les résultats obtenus dans d'autres modèles de pathologies inflammatoires suggèrent que l'IL-15 augmente les réponses délétères. Par exemple, plusieurs rapportent que l'IL-15 augmente la production d'IL-17 une cytokine inflammatoire, par les lymphocytes T humains et de souris (Ziolkowska et al. 2000, Wan et al. 2011). Une étude plus approfondie de l'IL-15 dans le contexte de la SEP et de ses modèles animaux sera donc nécessaire afin d'élucider le rôle de cette cytokine.

5.0 La sclérose en plaques

La SEP est une maladie inflammatoire du SNC. Elle est caractérisée par une démyélinisation, une perte axonale, l'activation de cellules gliales, l'infiltration de cellules immunes et une inflammation locale. Il s'agit d'une maladie chronique qui affecte approximativement 2.3 millions d'individus à travers le monde (Browne et al. 2014). Bien que le ou les facteurs menant au déclenchement de la pathologie soient toujours inconnus, des facteurs génétiques et environnementaux ont été liés à la pathologie. L'infection par le virus d'Epstein-Barr (EVB) et la mononucléose qu'il cause, une faible exposition à la lumière, une déficience en vitamine D et la cigarette sont des facteurs de risque environnementaux qui ont été associés au développement de la SEP revue par (Milo and Kahana 2010). Plus récemment, la consommation de sodium a été associée à l'activation des cellules Th17 pathologiques dans la SEP (Kleinewietfeld et al. 2013, Wu et al. 2013). Ceci pourrait partiellement expliquer l'augmentation d'incidence de la maladie observée à travers le monde. Génétiquement, la SEP est une pathologie complexe. En effet, plusieurs études ont montré une augmentation du risque

lorsqu'un membre de la famille est affecté. Par contre, lorsqu'un jumeau monozygote est atteint, le deuxième n'a que 30% de risque de développer aussi la pathologie. Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer l'héritabilité génétique incomplète de la SEP. Il pourrait s'agir d'une interaction entre les gènes impliqués et le contexte environnemental (Hauser et al. 2013). Jusqu'à présent, plus de 20 régions de mutation des locus ont été identifiées, ayant individuellement, une faible incidence dans le risque de développer la maladie (International Multiple Sclerosis Genetics et al. 2011). Parmi eux, notons les modifications du CMH et particulièrement ceux du locus de HLA-DRB1 (antigène de leucocytes humain-DRB1), impliqué dans le système immunologique et qui représentent jusqu'à présent, le plus haut risque individuel de développer la maladie revue par (Habek et al. 2010). De plus, les gènes reliés à l'immunité sont généralement surreprésentés, particulièrement ceux associés à la différenciation des lymphocytes T auxiliaires ce qui suggère leurs importances dans la pathologie (International Multiple Sclerosis Genetics et al. 2011).

5.1 Les caractéristiques cliniques

Les caractéristiques cliniques de la SEP sont très variables au niveau des symptômes neurologiques. Ceci est dû à la localisation des zones atteintes, des attaques pathologiques ou de la progression de la maladie. Généralement, elle inclut une paralysie ou faiblesse de la zone affectée, une faiblesse neuronale motrice et une atteinte visuelle. Une atteinte cognitive peut aussi être observée (Compston and Coles 2008). Cliniquement, l'apparition de nouveaux signes pathologiques, l'évolution ou le maintien de ceux déjà existants sont des symptômes associés à une activité ou à une progression de la maladie. De plus, l'espérance de vie des personnes atteintes est réduite en moyenne de 7 à 10 ans avec des atteintes physiques qui demandent un support approprié (Kremenutzky et al. 2006). L'hétérogénéité dans l'évolution de la maladie et dans la composition des plaques observées chez les patients suggèrent que la SEP est un syndrome neurologique plutôt qu'une seule pathologie (Lucchinetti et al. 2000). Malgré tout, la SEP est cliniquement subdivisée en plusieurs formes dont les principales sont: le syndrome clinique isolée (la forme précoce de la SEP), la forme

cyclique, la forme progressive primaire, la forme progressive secondaire, et la forme progressive récurrente (Goldenberg 2012).

La majorité des patients débutent avec une forme cyclique de la pathologie (80-90%), c'est-à-dire une pathologie caractérisée par l'apparition de divers signes et symptômes suivis d'un rétablissement partiel ou total de ceux-ci. Lorsque la maladie progresse, le nombre de rechute diminue. En revanche, les patients entrent dans une phase secondaire progressive caractérisée par une diminution de l'inflammation, mais une augmentation des symptômes handicapants. Une petite fraction des patients atteints de la SEP n'auront pas de rechute, mais développeront plutôt une forme progressive primaire de la pathologie revue par (Goldenberg 2012). Les patients atteints de la forme cyclique ont souvent de sévères lésions détectées au niveau du SNC revue par (Hemmer et al. 2002) L'inflammation n'est pas aussi importante dans la forme progressive primaire de la SEP et dans la forme progressive secondaire de la SEP. Par contre, ces formes sont caractérisées par une atrophie du SNC qui suit l'évolution des symptômes déstabilisants revue par (Hemmer et al. 2002, Mohebiany 2011).

5.2 Le diagnostic

Le diagnostic de la SEP se base sur la démonstration de signes et symptômes attribuables à des lésions disséminées à travers l'espace et le temps et l'exclusion de toutes autres pathologies qui pourraient présenter des signes similaires à ceux associés à la SEP. Il n'existe malheureusement aucun examen de laboratoire définitif pour diagnostiquer la SEP. Par contre, plusieurs tests peuvent supporter le diagnostic clinique dont une analyse du LCR qui démontre la présence de bandes oligo-clonales (OCBs) d'immunoglobulines qui sont absentes du sérum et qui suggère la production d'anticorps à l'intérieur même du SNC, malgré que ceci ne soit pas spécifique à la pathologie. Plus récemment, l'imagerie cérébrale par résonance magnétique est devenue l'examen le plus sensible pour détecter et démontrer la présence de lésions au niveau du SNC. Cette technique est utilisée pour supporter le diagnostic et estimer l'activité pathologique de la maladie. Elle permet aussi de mesurer l'atrophie cérébrale et la perte axonale. Elle est utilisée en tant que mesure pour déterminer l'efficacité des essais cliniques (Ceccarelli et al. 2012).

5.3 La Barrière hémato-encéphalique et la SEP

La BHE est une structure dynamique composée de cellules endothéliales spécialisées qui séparent le SNC de la circulation systémique. Elle englobe aussi une interaction entre les astrocytes, particulièrement les processus *glia limitans* et la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales (Russi and Brown 2014). La BHE a comme fonction le maintien de l'homéostasie du SNC ainsi que l'optimisation du microenvironnement pour les fonctions neuronales. Pour cela, elle contrôle, entre autre, l'entrée des cellules et des molécules pouvant migrer dans le SNC. En condition physiologique normale, seulement un nombre limité de cellules immunitaires peuvent pénétrer la BHE. Ceci inclut les lymphocytes T qui le font dans un processus d'immuno-patrouille du SNC afin d'assurer un processus de restriction et de contrôle des agents pathogènes possiblement présents (Larochelle et al. 2011).

L'infiltration importante de cellules immunitaires au SNC observée chez les patients atteints de la SEP s'effectue grâce à la migration de ces cellules à travers la structure de la BHE. La BHE est déstabilisée chez les patients atteints de cette pathologie; par contre, l'élément primaire déclenchant une telle déstabilisation demeure inconnu. La migration des cellules immunitaires à travers la BHE compte plusieurs étapes qui de façon simplifiée inclut l'activation des cellules, le roulement de celles-ci à la surface de l'épithélium de la BHE, leur arrêt suivi de l'induction des séquences de la transmigration à travers la BHE. Chaque étape demande une interaction entre la BHE et la cellule en question par l'implication de différentes molécules d'adhérence dont l'expression est souvent modifiée dans le contexte de la SEP. Les bénéfices cliniques importants suite à l'utilisation de thérapies bloquant la migration de lymphocytes chez les patients de la SEP soulignent l'importance de l'interaction entre des lymphocytes T activés et la BHE dans la formation de lésions reliées à la SEP (Polman et al. 2006). Par contre, l'élimination complète de la migration des lymphocytes à travers la BHE arrête également toute forme d'immuno-surveillance, ce qui a comme conséquence l'apparition de graves problèmes d'infections dans le SNC chez certains patients revue par (Major 2010). Cette situation fait apparaître le besoin de bloquer spécifiquement certaines sous-populations de cellules périphériques néfastes dans le déroulement pathologique de la SEP sans influencer le fonctionnement des autres sous-populations cellulaires (Arbour and Prat 2015).

5.4 Le rôle des lymphocytes T dans la SEP

Historiquement, l'implication des lymphocytes T a toujours été considérée comme majeure dans la pathologie de la SEP. Plusieurs facteurs ont influencé l'établissement rapide de cette pensée, dont l'utilisation du modèle murin de l'EAE. Ceci est secondé par la forte association génétique entre la SEP et des gènes du CMH de classe II revue par (Gourraud et al. 2012). L'EAE est induite par l'immunisation avec des peptides de la myéline ou par transfert adoptif de lymphocytes T réactifs à la myéline revue par (Holmoy and Hestvik 2008). Les lymphocytes T activés et auto-réactifs contre des antigènes de la myéline induisent des signes et des symptômes similaires à la SEP. Par contre, la pathologie humaine comporte un degré de complexité bien plus grand que celle présente dans l'EAE (Steinman 2001).

Le répertoire normal du système immunitaire des êtres humains contient une certaine quantité de lymphocytes T auto-réactifs revue par (Walker and Abbas 2002). Parmi ceux-ci, certains lymphocytes reconnaissent des antigènes associés aux protéines de la myéline; ces lymphocytes T auto-réactifs sont détectés en proportions similaires ou plus élevées dans le sang des patients atteints de la SEP lorsque comparés avec des témoins sains (Crawford et al. 2004, Berthelot et al. 2008, Elong Ngonu et al. 2012). Toutefois, plusieurs études démontrent que les lymphocytes T réagissant spécifiquement contre la myéline chez les patients atteints de la SEP possèdent des caractéristiques différentes de ceux obtenus chez les donneurs sains. En effet, les lymphocytes T auto-réactifs des patients, activés par des peptides de la myéline, sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- γ et TNF) (Sharief and Thompson 1993, Strunk et al. 2000, Zang et al. 2004). De plus, les patients ont une proportion plus élevée de lymphocytes T à haute affinité et de phénotypes activés à la fois dans le sang et le LCR (Allegretta et al. 1990, Chou et al. 1992, Zhang et al. 1994, Vandevyver et al. 1995, Bielekova et al. 2004). Des tests cliniques subséquents ont démontré l'aspect pathogénique *in vivo* des lymphocytes T réactifs à la myéline (Bielekova et al. 2000, Arbour and Prat 2015).

5.4.1 Le rôle des lymphocytes T CD4 dans la SEP

Le déclenchement de l'EAE dans un modèle murin suivant le transfert de lymphocytes T CD4 spécifiques à la myéline sécrétant de l'IFN- γ (Fletcher et al. 2010, Lovett-Racke et al. 2011) et la détérioration des patients atteints de la SEP suivant l'injection d'IFN- γ (Panitch et

al. 1987, Panitch et al. 1987) sont les éléments qui ont pointé les lymphocytes Th1 et leur production de cette cytokine inflammatoire comme responsables de l'induction de la pathologie (Arbour and Prat 2015). En contrepartie, l'utilisation d'un modèle murin déficient pour le récepteur de l'IFN- γ (Ferber et al. 1996, Willenborg et al. 1996) et la neutralisation de la cytokine ont augmenté la sévérité de la pathologie (Lublin et al. 1993) démontrant que d'autres médiateurs immunologiques sont impliqués dans cette pathologie. Par la suite, une nouvelle sous-population lymphocytaire fut découverte, portant le nom de Th17. De plus, comme les Th1, le transfert de lymphocytes auto-réactifs Th17 est suffisant pour induire l'EAE dans des souris naïves (Langrish et al. 2005, Kroenke et al. 2008, Stromnes et al. 2008). Par contre, la déficience pour l'une des cytokines produites par les Th17, IL-17, IL-21 ou IL-22, ne protège pas contre l'induction de l'EAE (Codarri et al. 2013) démontrant que ces cytokines ne sont pas essentielles à la pathologie. Toutefois, le GM-CSF produit par les deux sous-populations Th1 et Th17 (Codarri et al. 2011, El-Behi et al. 2011) est maintenant considéré comme un facteur critique dans l'inflammation auto-immunitaire du SNC. En effet, des souris déficientes en GM-CSF sont résistantes à l'induction de l'EAE et l'administration de cette cytokine aggrave la pathologie dans des modèles murins (McQualter et al. 2001).

Chez l'être humain, une élévation des cytokines Th1 (IFN- γ) et Th17 (IL-17, IL-22) ainsi que du GM-CSF est détectée dans le LCR et le SNC des patients, spécialement durant la phase active de la pathologie (Carrieri et al. 1998, Monteyne et al. 1999, Kebir et al. 2009, Mellergard et al. 2010). Plus de 70% des lymphocytes T détectés dans les lésions chroniques et sévères expriment de l'IL-17 (Kebir et al. 2007, Tzartos et al. 2008). Il y a aussi des lymphocytes T CD4 activés qui produisent simultanément de l'IFN- γ et de l'IL-17 dans le cerveau de patients atteints de la SEP. De plus, ces cellules subissent une expansion préférentielle lorsqu'elles sont obtenues du sang de patients présentement en rechute. Elles ont aussi une plus grande capacité à traverser la BHE humaine (Kebir et al. 2009). Les cytokines clés de la différenciation des Th1/Th17 telles que l'IL-12 et l'IL-23 sont retrouvées à de plus hauts niveaux dans le LCR et/ou le SNC des patients SEP comparé à des témoins (Link 1998, Li et al. 2007). Malheureusement, l'utilisation d'un anticorps contre la sous-unité commune de leur récepteur n'a pas apporté d'amélioration clinique dans le cadre du traitement des patients atteints (Segal et al. 2008, Vollmer et al. 2011).

De plus, un sous-type de lymphocyte T CD4 ayant des propriétés cytotoxiques peut aussi participer aux évènements menant aux dommages tissulaires. Il a été démontré que des lymphocytes T CD4 qui expriment le NKG2C en plus de marqueurs tels le CD56, le NKG2D et le granzyme B sont plus nombreux dans le sang périphérique des patients SEP. Ces cellules ont la capacité d'éliminer des oligodendrocytes humains qui expriment le HLA-E, le ligand de NKG2C (Zaguia et al. 2013). Finalement, ces cellules sont détectées au sein des lésions du SNC des patients atteints de la SEP.

5.4.2 Le rôle des lymphocytes T CD8 dans la SEP

Contrairement à l'élimination de la vaste majorité des lymphocytes T via l'utilisation de l'anticorps anti-CD52, une glycoprotéine à la surface des lymphocytes matures (Investigators et al. 2008), la déplétion des lymphocytes T CD4 n'a pas eu d'effet bénéfique chez les patients atteints de la SEP (van Oosten et al. 1997). Ces observations ont incité la communauté scientifique à étudier la contribution des autres populations lymphocytaires dans la pathobiologie de la SEP. Les lymphocytes T CD8 ont déjà été impliqués dans de nombreux processus auto-immunitaires ciblant différents organes (Liblau et al. 2002). De nombreux travaux pointent vers une participation active des lymphocytes T CD8 dans les lésions du SNC des patients atteints de la SEP (Mars et al. 2011, Arbour and Prat 2015). En effet, il a été rapporté par plusieurs que les lymphocytes T CD8 sont égaux ou supérieurs en nombre comparativement aux lymphocytes T CD4 dans les lésions du SNC comportant une activité de démyélinisation et/ou de perte axonale (Booss et al. 1983, Hauser et al. 1986, Babbe et al. 2000, Neumann et al. 2002, Skulina et al. 2004). De plus, certaines sous-populations spécifiques de lymphocytes T CD8 tels que ceux exprimant MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*) sont surreprésentées chez les patients SEP en rechute en plus d'avoir des caractéristiques pathologiques requises pour aggraver la pathologie (Larochelle et al. 2015). Par ailleurs, une expansion clonale des lymphocytes T CD8 au sein du SNC, du LCR et des lésions, dans les patients atteints de la SEP a été observée, suggérant une réponse antigène spécifique dont certains clones peuvent être détectés pendant plusieurs années (Babbe et al. 2000, Jacobsen et al. 2002, Skulina et al. 2004, Junker et al. 2007). Il s'agit d'une différence importante avec les lymphocytes T CD4 du SNC des patients SEP qui sont eux, de nature plus hétérogènes (Babbe et al. 2000, Jacobsen et al. 2002, Skulina et al. 2004, Junker et al. 2007).

Une augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8 a été mesurée dans le LCR et serait liée à un épisode de rechute clinique de la SEP (Malmstrom et al. 2008). L'expression du CMH de classe I par les cellules du SNC (oligodendrocytes et neurones), cible des lymphocytes T CD8 dans la SEP, corrèle avec l'évolution de la pathologie (Hoftberger et al. 2004).

Dans le modèle murin, tel que pour les lymphocytes T CD4, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 activés et spécifiques pour des antigènes de la myéline est suffisant pour induire le modèle de l'EAE (Goverman et al. 2005). De plus, les résultats obtenus dans des modèles murins induisant une démyélinisation par un modèle viral suggèrent l'implication des lymphocytes T CD8 dans les aspects de démyélinisation et de blessures axonales (Murray et al. 1998, Wu et al. 2000, Howe et al. 2007). L'activation des lymphocytes T CD8 par une infection virale peut, dans certaines situations permettre aux lymphocytes T CD8 de reconnaître un antigène viral et un antigène de la myéline pouvant conséquemment déclencher une réaction auto-immunitaire dans le SNC (Ji et al. 2010).

À l'inverse, certains travaux ont associé un rôle régulateur aux lymphocytes T CD8 dans le modèle de l'EAE (Jiang et al. 1992, Koh et al. 1992, York et al. 2010) et revue par (Johnson et al. 2007) qui est renforcé par une exacerbation de la pathologie lorsque ceux-ci sont éliminés juste avant l'induction du modèle de l'EAE (Montero et al. 2004). Il a aussi été démontré que les modèles murins n'ayant pas de lymphocytes T CD8 et de CMH de classe I fonctionnel ont une évolution plus sévère de la pathologie suite à l'induction de l'EAE (Linker et al. 2005). Ceci pourrait être un indice qu'une sous-population de lymphocytes T CD8 serait bénéfique dans la SEP. À cet effet, une corrélation inverse des fonctions suppressives des lymphocytes T CD8 et de la pathologie ainsi qu'une diminution de la reconnaissance des lymphocytes T CD4 spécifiques à la myéline par les lymphocytes T CD8 a été avancée dans la SEP (Correale and Villa 2008). Ces données suggèrent que des sous-populations des lymphocytes T CD8 peuvent jouer un rôle et qu'il est donc important de bien discerner et caractériser de telles sous-populations dans le contexte de la SEP.

5.4.3 Les lymphocytes T DP dans la SEP

Seulement deux études ont abordées le sujet des lymphocytes T DP dans la SEP (Munschauer et al. 1993, Waschbisch et al. 2014). La première démontre uniquement une augmentation périphérique des lymphocytes T DP entre les patients et les donneurs sains (Munschauer et al. 1993). La deuxième ne note pas de différences entre les patients et les donneurs sains, mais explique la différence des observations rapportées entre leurs résultats et ceux du groupe précédent par la composition respective de leur banque de patients. En effet, le groupe de Waschbisch utilise une banque de patients composée seulement de personnes atteintes de la forme cyclique de la SEP alors que la banque du groupe de Munschauer contient une forte proportion de patients atteints de la forme secondaire progressive (Waschbisch et al. 2014). De plus, Waschbisch et collègues ont évalué la forme de l'expression du récepteur CD8 retrouvé sur les lymphocytes T DP, c'est-à-dire la forme $\alpha\alpha$ et $\alpha\beta$ retrouvé respectivement sur les lymphocytes $CD4^{\text{haute}}CD8^{\text{bas}}$ et $CD4^{\text{bas}}CD8^{\text{haut}}$. Toutefois, malgré une variation interpersonnelle très importante, ils n'observent aucune différence dans la fréquence des ces deux sous-populations entre les patients et les donneurs sains. Ils notent aussi qu'une plus grande proportion de lymphocytes T DP ont un phénotype effecteur mémoire. L'évaluation de l'expression du CD45RO, du CCR7 et du CD62L n'a pas non plus démontré de différence entre les patients et les donneurs sains dans l'expression du CD45RO, du CCR7 et du CD62L. Par contre, les lymphocytes T DP ont connu une expansion plus robuste comparée aux lymphocytes T CD4 ou CD8 lorsqu'ils ont été exposés à des peptides viraux d'intérêts tels que ceux du virus de l'EBV. L'évaluation de la production d'IFN- γ révèle que celle-ci est supérieure chez les lymphocytes T DP comparativement aux lymphocytes T CD4 ou CD8 autant chez les patients que chez les donneurs sains. Une augmentation de la fréquence des lymphocytes T DP a aussi été observée dans le LCR comparativement à la périphérie, mais sans différence entre les patients et les donneurs sains. De plus, Waschbisch et collègues n'ont pas observé la présence de lymphocytes T DP parmi les sites de lésions du cerveau des patients atteints de la SEP. En bref, les lymphocytes T DP seraient des cellules ayant un phénotype mémoire possédant un potentiel cytotoxique qui selon Waschbisch et collègues pourraient avoir un rôle dans l'immunosurveillance dans l'environnement du LCR (Waschbisch et al. 2014).

5.5 Le rôle des lymphocytes B dans la SEP

La présence sélective de clones d'immunoglobulines dans le compartiment du SNC, dont dans le LCR, chez plus de 95% des patients est un argument logique de l'implication des lymphocytes B dans la pathologie de la SEP. L'identification des antigènes reconnus par de telles immunoglobulines est encore un sujet d'investigation. De plus, des immunoglobulines ainsi que des facteurs du système du complément sont détectés dans les lésions du SNC des patients atteints de la SEP, ce qui suggère que ces molécules jouent un rôle dans la pathologie (Storch et al. 1998, Magliozzi et al. 2007). Malgré la découverte d'anticorps dirigés contre des protéines de la myéline, telles la protéine basique de la myéline (MBP) et la glycoprotéine de la myéline des oligodendrocytes (MOG), leur importance dans la pathologie est toujours incertaine (Hestvik 2010). Plus récemment, l'antigène de la crystalline- $\alpha\beta$ a été proposé comme cible des immunoglobulines; cet antigène n'est pas présent dans la myéline, mais est plutôt détecté dans les premières lésions actives de la SEP. De plus, les patients possèdent des anticorps dirigés contre celui-ci dans leur LCR (Holmoy and Hestvik 2008). Lorsque le gène codant pour la crystalline- $\alpha\beta$ est neutralisé dans un modèle murin de l'EAE, la pathologie est plus sévère (Ousman et al. 2007). Ceci suggère un rôle protecteur de la crystalline- $\alpha\beta$ qui serait perturbé par la réaction immunitaire pathologique (Hoglund and Maghazachi 2014). Un autre candidat n'étant pas directement relié à la myéline serait la Neurofascine. Cet antigène est exprimé par les axones neuronaux et des anticorps dirigés contre ceux-ci ont été détectés chez les patients atteints de la SEP, ce qui pourrait contribuer aux dommages axonaux (Mathey et al. 2007).

De plus, des structures folliculaires de lymphocytes B, de lymphocytes T et de CPA ont été identifiées dans les méninges des patients à des stages plus avancés de la SEP (progressive secondaire de la SEP, mais pas progressive primaire de la SEP) (Serafini et al. 2006, Magliozzi et al. 2007). Toutefois, ces résultats sont le résultat des travaux d'un seul groupe de recherche et n'ont pu être confirmés par d'autres (Haugen et al. 2014). Il a été démontré dans l'EAE que les lymphocytes B, agissant comme des CPA par leur expressions de CMH de classe II, occupent un rôle important dans la pathologie du SNC et ce, indépendamment de leur implication au niveau de l'immunité humorale (Molnarfi et al. 2013). Toujours chez les modèles de l'EAE, les lymphocytes B produisant une plus grande quantité

d'IL-6 ont aussi été notés comme pathologique d'autant plus qu'une plus grande production d'IL-6 a aussi été observé chez les patients SEP (Barr et al. 2012). Les lymphocytes B pourraient contribuer à la pathologie par leur présentation d'antigènes, une interaction cellulaire avec d'autres cellules immunitaires ou par la production de cytokines (Hestvik 2010). Ceci est renforcé par de récentes études qui démontrent l'importance des lymphocytes B dans des modèles murins de pathologies auto immunes où une production déficiente d'IL-10 et ou d'IL-35 et l'augmentation de cytokines pro inflammatoires causent une détérioration de la pathologie (Fillatreau et al. 2002, Duddy et al. 2007, Matsushita et al. 2008, Bar-Or et al. 2010, Barr et al. 2012, Matsumoto et al. 2014, Miyazaki et al. 2014, Rosser et al. 2014, Shen et al. 2014, Wang et al. 2014). Dans la SEP, les lymphocytes B produisent moins d'IL-10 mais plus de médiateurs pro inflammatoires tels que la lymphotoxine, le TNF α , l'IL-6 et de GM-CSF (Duddy et al. 2007, Bar-Or et al. 2010, Barr et al. 2012, Li et al. 2015).

5.6 Le rôle des cellules NK dans la SEP

Les cellules NK sont de larges lymphocytes granulocytaires qui possèdent l'habilité de lyser spontanément des cellules cibles sans avoir été préalablement sensibilisées ou activées (Whiteside and Herberman 1989). Elles possèdent aussi plusieurs caractéristiques immuno-régulatrices incluant la sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'interaction par contact cellulaire avec d'autres cellules (Maghazachi 2000, Maghazachi 2010). Elles ont des rôles fonctionnels importants dans la réponse immunitaire dirigée contre les virus ainsi que sur le contrôle de la croissance des tumeurs (Maghazachi and Al-Aoukaty 1998, Yang et al. 2006). Les cellules NK peuvent reconnaître et être activées par des cellules en situation de détresse via l'expression de ligands de stress spécifique. Les cellules NK possèdent des récepteurs cytotoxiques naturels tels que le NKp30, le NKp44, le NKp46 ainsi que le récepteur type-C lectine NKG2D capables se lier à ces ligands revue par (Maghazachi 2005, Kaur et al. 2013). L'activité des cellules NK est maintenue en équilibre par de nombreux signaux d'activation et d'inhibition dont l'interaction avec le CMH de classe I. L'absence d'expression du CMH de classe I à la surface de la cellule a comme conséquence l'activation des cellules NK et la destruction des cellules cibles (Oberg et al. 2004).

Les études portant sur les rôles des cellules NK dans des modèles murins de l'EAE, se sont révélées conflictuelles. Dans certains modèles, leurs actions se sont avérées bénéfiques alors que dans d'autres, elles étaient plutôt délétères revue par (Hoglund and Maghazachi 2014). L'activité fonctionnelle des cellules NK est variable, mais généralement plus basse dans les patients atteints de la SEP que dans les donneurs sains (Kastrukoff et al. 1998). Une diminution du nombre de cellules NK dans le sang a été associée avec une augmentation du risque de rechute. Il y aurait aussi une corrélation entre une activité élevée des cellules NK et le nombre de lésions détectées par IRM (imagerie par résonance magnétique) (Grunebaum et al. 1989). Une réduction du nombre de cellules $CD8^{\text{basse}}CD56^+CD3^-CD4^-$ a été rapportée chez des patients non-traités avec des signes cliniques isolés de la SEP comparée à des donneurs sains (De Jager et al. 2008). Parmi les différentes hypothèses concernant le fonctionnement des cellules NK, sans égard à leur rôle positif ou négatif, notons que certaines de celles-ci pourraient découler de leurs interactions avec des cellules DC revue par (Maghazachi 2013). En effet, les cellules NK activées peuvent éliminer les DC immatures tout en épargnant les DC matures. Toutefois, les phénomènes entourant cette interaction sont mal compris.

5.7 Les thérapies contre la SEP

Les thérapies actuellement disponibles pour traiter la SEP ne sont que partiellement efficaces. Leurs développements dépendent de notre compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie, mais qui demeure à ce jour toujours limitée. La plupart des thérapies utilisées dites immuno-modulatrices modifient des fonctions du système immunitaire et ont démontré une certaine efficacité chez les patients atteints de la forme cyclique de la SEP. Malheureusement, elles sont aussi le résultat d'une balance entre les risques secondaires encourus et l'efficacité recherchée qui est dictée par la réponse du patient aux traitements utilisés.

L'**IFN- β** est un traitement immuno-régulateur injecté par voie intramusculaire ou sous-cutanée (Cohen and Rieckmann 2007). Il augmente la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-4/IL-10), induit une réponse Th2 et réduit ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12/IL-17/IL-23) revue par (Kieseier 2011). Cette drogue réduirait l'adhérence cellulaire et l'expression de MMP-9 (métallo-protéase matricielle 9) (Frohman et

al. 2006) et favoriserait la migration des cellules Th2 (Prat et al. 2005). L'IFN- β diminue aussi l'expression du CMH de classe II sur les lymphocytes B ainsi que l'habilité de ces cellules à présenter des antigènes aux lymphocytes T revue par (Boster et al. 2010, McGraw and Lublin 2013)

L'acétate de glatiramère est une mixture synthétique standardisée de quatre acides aminés (l'alanine, la glutamine, la lysine et la tyrosine) aléatoire polymérisée (Carter and Keating 2010). Le traitement consiste en une injection journalière sous-cutanée. L'acétate de glatiramère se lie au CMH de classe II reconnaissant la myéline et induit un changement de phénotype de cellules Th1 à Th2 situées en périphérie (Blanchette and Neuhaus 2008, Boster et al. 2010, Carter and Keating 2010). Il augmente aussi le nombre de Treg et de cytokines anti-inflammatoires (Frohman et al. 2006) et leurs fonctionnalités (Hong et al. 2005). Son action stimule aussi la production de facteurs neurotrophiques supportant la survie des cellules neuronales et gliales (Sarchielli et al. 2007).

Le Natalizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la sous-unité α_4 (CD49d) de l'intégrine VLA4 (*very late antigen-4*) (Elovaara et al. 2000, Planas et al. 2014). Cette intégrine est exprimée par tous les leucocytes à l'exception des neutrophiles. L'action du *Natalizumab* empêche plusieurs phénomènes de migration dont celui des lymphocytes à travers la BHE (Elices et al. 1990, Planas et al. 2014). Il s'agit d'un traitement intraveineux (Cohen and Rieckmann 2007). Bien qu'efficace, les effets secondaires peuvent être sévères, incluant des cas rapportés de leuco-encéphalopathies multifocales progressives revue par (Lopez-Diego and Weiner 2008, Boster et al. 2010).

Le fingolimod est un modulateur oral du récepteur Sphingosine 1-phosphate (S1P). En tant qu'antagoniste du récepteur, il réduit le nombre de lymphocytes en circulation en séquestrant les lymphocytes T naïfs et mémoires centraux dans les organes lymphatiques secondaires revue par (Mehling et al. 2011, Planas et al. 2014). Son action a un potentiel immunosuppresseur pour le traitement de la SEP revue par (Lopez-Diego and Weiner 2008) en empêchant la migration des lymphocytes dans tous les organes incluant le SNC. Finalement, il s'agit d'un traitement dont l'effet dépend de la dose, qui est réversible et qui diminue le compte périphérique des lymphocytes B et T (Brown et al. 2007).

Le Tériflunomide a été récemment approuvé pour le traitement de la SEP revue par (Brunetti et al. 2013). Il inhibe de façon réversible et non compétitive la synthèse de nouvelles pyrimidines (Davis et al. 1996). Ceci a pour conséquence l'arrêt de la prolifération cellulaire des lymphocytes B et T à division rapide en périphérie. Par contre, les lymphocytes à division lente peuvent continuer à proliférer par l'activation de mécanismes secondaires de synthèse de pyrimidine. L'activation des lymphocytes T serait aussi limitée par le manque de molécules messagères secondaires dépendantes de la pyrimidine. Il nuirait aussi à l'interaction des lymphocytes T avec les CPA à l'intérieur du SNC, limitant ainsi leurs activations et leurs actions pro-inflammatoires revue par (Gold and Wolinsky 2011).

Le diméthyle fumarate est un médicament oral récemment approuvé pour le traitement de la SEP cyclique revue par (Burness and Deeks 2014). Bien que son mode d'action thérapeutique dans la SEP, de même que celui de son métabolite principal le monométhyle de fumarate, soit inconnu, il semble lié à l'activation du facteur de transcription nucléaire NRF2 (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) (Linker et al. 2011, Scannevin et al. 2012). Celui-ci est connu pour être un régulateur du stress oxydatif et de la réponse métabolique au stress. Son activation aurait des effets neuro-protecteurs revue par (Phillips and Fox 2013). Le diméthyle fumarate, un acide ester fumarique, est capable de modifier une réponse Th1/Th17 vers une réponse Th2 anti-inflammatoire (Ghoreschi et al. 2011, Peng et al. 2012).

Hypothèse et objectifs

Hypothèse :

Plusieurs équipes de recherche ont démontré la présence de lymphocytes T double positifs ($CD4^+CD8^+$ ou DP) dans le sang des donneurs sains ainsi que chez des patients atteints de nombreuses pathologies. Cependant, peu d'études ont caractérisé les propriétés de ces cellules. Des travaux ont proposé que les cellules DP aient un phénotype se rapprochant des cellules T effectrices mémoires, suggérant qu'elles ont participé ou peuvent participer à des réponses immunes. Finalement, notre laboratoire a démontré que la cytokine IL-15 est exprimée à des niveaux plus élevés par les cellules du sang périphérique et du système nerveux central chez les patients atteints de la SEP en comparaison à des donneurs sains. Cette cytokine joue un rôle important dans la survie et l'activation des lymphocytes T.

Nous avons émis l'hypothèse que *les lymphocytes T DP représentent une sous-population hautement activée de lymphocytes T pouvant répondre à l'IL-15 et ayant des propriétés pouvant contribuer aux aspects inflammatoires présents dans la SEP.*

Objectifs :

Afin de déterminer la véracité de notre hypothèse, nous avons élaboré les objectifs suivants :

1. Déterminer une stratégie précise et valable pour l'analyse multiparamétrique par cytométrie de la population des lymphocytes T DP
2. Comparer l'impact de l'IL-15 sur cette population cellulaire par rapport aux autres populations lymphocytaires.
3. Évaluer les phénotypes et les propriétés des lymphocytes T DP.

Matériels et Méthodes

1.0 Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique humain

Le sang périphérique veineux des donneurs sains et des patients fut récolté dans des tubes sous vide de 10 cc traités à l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) VACUTAINER® (Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada). L'isolement des PBMC s'est effectué par gradient de densité en utilisant le Ficoll-Paque Plus™ (Ficoll) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Le sang fut mélangé à part égale à une solution saline tamponnée de phosphate (PBS) [137 mM NaCl (Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada), 2.7 mM KCl (Wisent), 4.3 mM Na₂HPO₄ (Wisent) et 1.47 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)] contenant 2 mM EDTA (Wisent) [PBS-EDTA] pour éviter l'aggrégation des cellules lors de l'isolement des PBMC. Un volume de 35ml de sang dilué fut déposé par tube de 50 mL (Corning, Fisher Scientific Ltd., Nepean, ON, Canada), puis 14 mL de Ficoll fut placé sous le sang dilué de sorte à avoir deux phases (le mélange sanguin à la surface sur un fond de Ficoll). Les tubes furent centrifugés à 863 g pour une période de 30 minutes en absence de freins afin de ne pas perturber la séparation des couches de cellules. Par la suite, la couche superficielle composée du sérum fut jetée et la couche composée de PBMC située juste au-dessous de celle-ci fut récoltée et transférée dans de nouveaux tubes de 50ml pour effectuer une série de lavages (30-45ml/tube) avec du PBS-EDTA afin d'éliminer le Ficoll . Le premier lavage fut effectué à 624 g pendant 15 minutes. Le surnageant fut ensuite jeté puis, le culot de PBMC resuspendu pour deux autres lavages à 432 g pendant dix minutes. La quantité de PBMC obtenue fut calculée à l'aide d'un hémacytomètre en utilisant le bleu de trypan (0.16%v/v) (Wisent) pour exclure les cellules mortes. La formule mathématique utilisée pour déterminer le nombre de cellules est la suivante:

$$\text{Le nombre total de cellules} = N \times \text{facteur de dilution} \times V \times 10^4$$

Où N est la moyenne du nombre de cellules comptées dans un minimum de deux chambres de l'hématocytomètre et V est le volume total de la suspension cellulaire. Les PBMC obtenues furent ensuite resuspendues dans le milieu approprié pour les étapes subséquentes.

2.0 Étude fonctionnelle des cellules humaines

2.1 Stimulation cellulaire par l'IL-2 ou l'IL-15

Dans le but d'étudier la signalisation induite par l'activation des lymphocytes T en réponse à l'IL-2 et l'IL-15, des PBMC fraîchement isolées ont été resuspendues dans un milieu d'Iscove sans sérum et laissées reposer 1h à 37°C. Ce temps de repos est nécessaire pour contrer le stress cellulaire produit lors de l'isolement des PBMC qui pourrait faussement augmenter l'activation de base des cellules. Les cytokines d'intérêts ont par la suite été rajoutées aux concentrations testées, décrit ultérieurement, en présence des cellules à une concentration finale de 5 millions/ml. Les stimulations ont été arrêtées en mettant les cellules rapidement sur glace jusqu'à l'étape de lavage et marquage subséquents. Bien que la cytokine d'intérêt ait été l'IL-15, l'IL-2 a été utilisée comme témoin expérimental étant donné que ces deux cytokines partagent deux chaînes de leur récepteur (CD122/CD132).

Une cinétique a d'abord été effectuée sur des PBMC fraîchement isolées traitées soit avec l'IL-15 ou l'IL-2 pour des temps de 0, 5, 15, 30, 60 et 90 minutes. La dose utilisée fut de 5ng/ml pour l'IL-15 et de 1000U/ml pour l'IL-2. Suite aux expériences de cinétiques, des expériences de dose réponse furent effectuées à un temps optimal déterminé à 15 minutes à des doses variables d'IL-15 provenant de Perotech (0.2ng/ml, 0.6ng/ml, 1ng/ml, 2.5ng/ml, 5ng/ml) et d'IL-2 provenant de Hoffmann-La Roche (10U/ml, 50U/ml, 200U/ml, 500U/ml, 1000U/ml).

2.2 Cytométrie en flux

Dans le but d'éliminer les sites de conjugaisons non-spécifiques aux anticorps utilisés, les PBMC fraîchement isolées ou les cellules d'intérêts préalablement purifiées, furent

bloquées à l'aide d'immunoglobulines normales de souris (Caltag-Invitrogen) et selon la nature des anticorps utilisés de rat ou de chèvre avec l'ajout d'immunoglobulines de rat (Biolegend) et/ou de sérum de chèvre (Sigma) un minimum de 30 minutes à 4°C. Les cellules furent ensuite mises en contact avec les anticorps requis ainsi que parallèlement ceux des contrôles isotypiques nécessaire à une concentration finale d'environ deux million de cellules dans un volume de 100ul de tampon de FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) (PBS contenant 1% (v/v) de FBS et 0.1% (p/v) NaN₃). Une liste des anticorps utilisés est disponible au tableau I. Les marquages de surface ont été effectués à 4°C pour une durée minimale de 60 minute et maximale jusqu'au lendemain matin à 4°C. Les cellules furent lavées dans du tampon de FACS, puis fixées à l'aide d'une solution de Formaldéhyde 1%(p/v) dans du PBS. Les cellules ont été fixées et perméabilisées à l'aide d'un tampon de paraformaldéhyde (PFA) et de saponine [Solution balancé de sels de Hank's (HBSS) (Wisent), contenant 4% (p/v) de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich), 1 mM d'HEPES (Wisent), et 0.1% (p/v) de saponine de Quilla JA Bark (Sigma-Aldrich)] à température ambiante à l'abri de la lumière pendant dix minutes suivi de deux lavages subséquents avec un tampon de saponine (PBS contenant 0.1% (v/v) de saponine, 1% FBS et 0.1% NaN₃). Les cellules furent par la suite marquées 45 minutes à 4°C avec les anticorps détectant des molécules intracellulaires (voir tableau I) dans un tampon de saponine, puis lavées. Le culot fut resuspendu dans un tampon FACS et gardé au noir à 4°C jusqu'à l'acquisition des données. Des marquages de contrôles furent utilisés pour calibrer les compensations de chaque acquisition incluant des cellules non marquées ou marquées de chaque anticorps individuel présent dans le marquage. De plus des expériences de (FMO) (fluorescences moins un fluorochrome) ont été effectués afin de valider les mélanges d'anticorps et périodiquement, un marquage de viabilité cellulaire. Toutes les informations relatives au cytomètre en flux sont incluses au tableau II.

Pour déterminer l'expression des cytokines des PBMCs suite à une activation, les PBMCs ont été mis en culture dans un milieu complet RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) (Sigma-Aldrich) (2×10^6 cells/ml) dans des tubes *snap cap* 5ml (1ml par tube) dans un incubateur CO₂ 5% à 37°C ou bain-marie suite à une stimulation à l'aide de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 20ng/ml) (Sigma-Aldrich), ionomycin (500ng/ml) (Sigma-

Aldrich) et de brefeldin A de *Penicillium Brefeldianum* (BFA; 5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) 5 heures puis, marqués tel que précédemment décrit.

Lors des expériences concernant la phosphorylation des STAT3 et STAT5, un protocole de marquage particulier et optimisé par notre laboratoire a été utilisé. Suite à la cinétique ou dose/réponse (section 2.1), les cellules furent marquées une heure à 4°C dans du tampon de FACS par les anticorps et fluorochrome de surface spécifique selon le tableau (II). Les cellules furent lavées et resuspendues dans 500 μ l de tampon fraîchement préparé de PBS contenant 1.5% (p/v) de PFA pour fixer les cellules à température ambiante à l'abri de la lumière pendant dix minutes suivi d'un lavage et resuspendu délicatement avec l'ajout de 200 μ l de BD Perm buffer III (BD Biosciences). Les cellules furent laissées sur glace 30 minutes au noir, puis lavées à deux reprises avec du tampon de FACS et centrifugé à 6000 RPM. Les cellules furent ensuite marquées pour détecter les formes phosphorylées des STAT3 et STAT5 à l'aide des anticorps du tableau III une heure à 4°C dans du tampon de FACS, avant d'être lavées et resuspendues dans 200 μ l de tampon FACS. L'acquisition des données a été effectuées sur un appareil FACS LSR II (BD Biosciences) à l'aide du logiciel Diva v7.0 (BD Biosciences) tandis que les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel FlowJo vX (Treestar, San Carlos, CA).

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du programme informatique Prism GraphPad 5 (San Diego, Ca, USA) et incluent les tests analytiques suivants : le test de Student, one-way ANOVA et two-way ANOVA. Les résultats sont montrés en tant que moyenne avec une barre d'erreur standard de la moyenne (SEM) ou en tant que point individuel. Seulement les valeurs p plus petite que 0.05 ont été considérées comme significatives.

Tableau I: Liste des anticorps/fluorochromes utilisés pour les analyses de cytométrie en flux

SURFACE	ug/marquage	Fournisseur commercial
CD3-A700	0,1	BD
CD3-FITC	0,0625	BD
CD3-PE	0,0625	BD
CD4-APC	0,0625	BD
CD4-PB	0,04	BD
CD4-PECy7	0,06	BD
CD4-PerCP-Cy5.5	0,2	BD
CD8-PE	0,0125	BD
CD8-APC-Cy7	0,1	BD
CD8 β -PE	0,05	Beckman Coulter
CD8-PB	0,01	BD
CD14-APC	0,125	BD
CD14-APC-H7	0,05	BD
CD14-FITC	0,5	BD
CD45RA-FITC	0,1	BD
CD45RO-PerCP-Cy5.5	0,5	BD
CD56 PE-Cy7(N-CAM)	0,25	BD
CD57-APC	0,05	BD
CD95-FITC	0,0625	BD
CD122-PE (IL-15RBeta)	0,4	BD
CD132 biotinylé	5	BD
CD161-FITC	0,5	BD
CD196-PE (CCR6)	0,4	BD
CCR7-PECy7	0,25	BD
CXCR3-PE	0,125	R&D
Gp130-PE	0,25	R&D
NKG2D-APC	0,25	BD
PD-1-PE (CD279)	0,25	ebioscience
PD-L1 biotinylé	0,25	ebioscience
PD-L2 biotinylé	0,05	ebioscience
TCR $\alpha\beta$ -FITC	0,125	ebioscience
TCR-PE (INK T)	1	BD
TCR $\gamma\delta$ biotinylé	5	BD
Secondaire		
Strep-APC	0,1	BD
Strep-PE	0,08	invitrogène
Strep-PerCP-Cy5.5	0,1	BD
Intracellulaire		
Stat3 p-A647	0,015	BD
Stat5 p-PE	0,03	BD
Granzyme A-PE	0,06	BD
Granzyme B-A647	0,025	BD
Granzyme B-APC	(1/10) 2ul	Caltag laboratories
GM-CSF-PE	0,4	BD
IFNg-Alexa488	0,2	BD
IL-4-PE	0,1	BD
IL-5-PE	2,5	BD
IL-17A-efluor660	0,125	BD
IL-21-PE	0,125	BD
Perforine-PE	10ul	Abcam
TNF-alpha-PE	0,05	BD

Tableau II: Liste des fluorochromes utilisés pour les analyses de cytométrie en flux

Fluorochromes	Abréviations	Longueur d'onde du laser	Filtre passe longue	Filtre au niveau du PMT
Isothiocyanate de Fluorescéine	FITC	488	505	530/30
Phycoérythrine	PE	488	550	575/26
Pacific Blue TM	PB	405		440/40
Allophycocyanine	APC	633		660/20
Allophycocyanine-Cy7	APC-Cy7	633	740	780/60
Phycoérythrine-Cy7	PE-Cy7	488	750	780/60
Alexa Fluor [®] 700	A700	633	690	720/30
Alexa Fluor [®] 647	A647	633		660/20
Allophycocyanine-H7	APC-H7	640	740	780/60
Alexa Fluor [®] 488	A488	488	505	530/30
Efluor [®] 660	E660	633		660/20
PerCP-Cy5.5	PerCP5.5	488	690	710/50

Tableau III: Liste des anticorps et méthodologie pour le marquage des STATs

	Marquages d'intérêt	
	Anticorps/ Fluorochromes	ug/marquage
Avant fixation	CD8-PB	0,04
	CD3-A700	0,4
Après fixation	CD4-PECy7	0,15
	CD45RA-FITC	0,2
	CD45RO-PerCP-Cy5.5	0,5
	STAT3-APC	0,015
	STAT5-PE	0,03

Résultats

1.0 Identification de la population de lymphocytes T DP.

1.1 Optimisation de l'analyse multiparamétrique par cytométrie en flux des lymphocytes T DP.

Préalablement à cette étude, certains travaux effectués dans notre laboratoire ont permis d'observer une petite sous-population de lymphocytes T exprimant à la fois les corécepteurs CD4 et CD8 parmi les PBMCs de patients atteints de la SEP et de témoins sains. Intrigués par la présence de cette sous-population ainsi que par la littérature extrêmement limitée à leur sujet, nous avons décidé d'effectuer leur caractérisation. Ceci, dans le but ultime de pouvoir déterminer si cette sous-population de lymphocytes T est altérée dans le contexte de la SEP.

Le tableau IV rassemble quelques informations sur les caractéristiques des patients atteints de la SEP et non traités qui ont gracieusement accepté de participer à la recherche. Les patients étaient majoritairement des femmes; sur 25 patients seulement deux étaient des hommes. La moyenne d'âge des participants était de 42 ans. Le plus jeune patient avait 26 ans et le plus âgé, 60 ans. Tous les participants avaient la forme cyclique de la SEP.

Tableau IV : Composition de la banque de patients

homme	2
femme	23
total	25
moyenne d'âge	42,7

Un exemple représentatif de la stratégie d'analyse utilisée est présenté à la figure 6. Elle débute en **(A)** par la sélection des PBMCs sur la base de leur grosseur et granularité déterminées par les signaux FSC-A (*forward-scattered light area*) et SSC-A (*side-scattered light area*). Une seconde sélection des PBMCs par les signaux FSC-W (*width*) et FSC-A en **(B)** a pour but d'éliminer les doublets dans les analyses subséquentes, ceux-ci pouvant créer

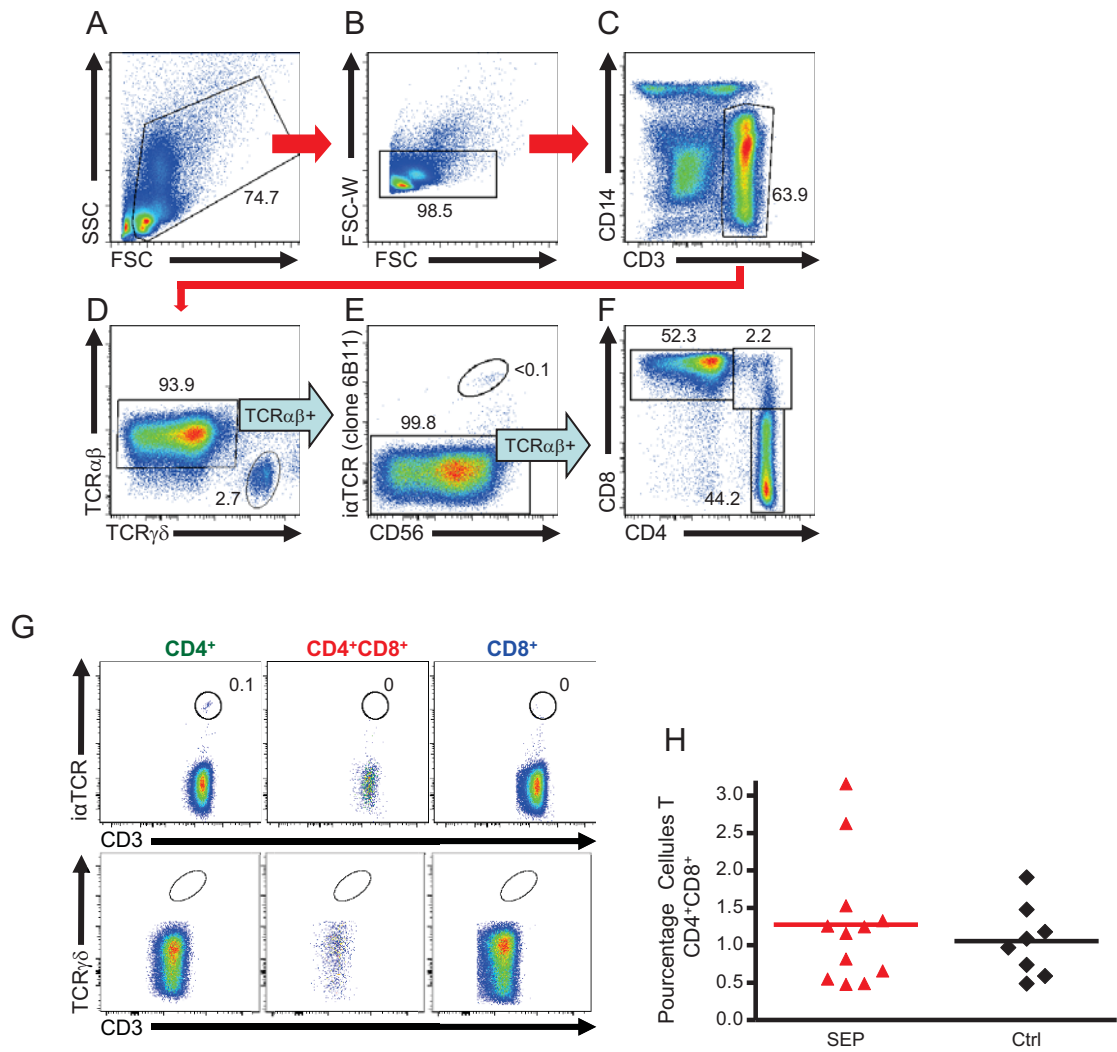


Figure 6: Les lymphocytes T CD4⁺CD8⁺ doubles positifs représentent un sous-type lymphocytaire distinct.

A-F: Un exemple représentatif de la stratégie des plages de sélection des diverses populations cellulaires d'intérêt est illustré. Les PBMCs *ex-vivo* d'un donneur sains ont été marqués pour détecter: CD3, CD4, CD8, CD56, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ et α TCR et analysés par cytométrie. Les cellules T CD4⁺CD8⁺ représentent une sous population distincte des cellules T $\gamma\delta$ et des cellules TNK. G) Une analyse alternative démontre que les cellules T CD4⁺CD8⁺ n'expriment pas le TCR $\gamma\delta$ et le α TCR. H) Le pourcentage de cellules T CD4⁺CD8⁺ parmi toutes les cellules T (CD3⁺) a été analysé tel que décrit plus haut pour 8 donneurs sains et de 12 patients non traités atteints de la SEP. Chaque point représente un donneur.

de faux signaux positifs. La sélection des cellules exprimant le CD3 (C) est suivie de la sélection des cellules ayant un TCR $\alpha\beta$ (D). Les NKT sont éliminées à l'aide d'un marquage de leur α TCR (clone 6B11) (E). Cette stratégie d'analyse multiparamétrique permet une sélection très sévère des lymphocytes T DP afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un marquage non-spécifique. Finalement, il est possible d'observer une excellente séparation des populations des lymphocytes T CD4, CD8 et DP (F).

Bien que cette stratégie de sélection fonctionne très bien, elle utilise de nombreux canaux de fluorescence. Nous avons donc déterminé une stratégie de sélection moins complexe, mais équivalente qui nous a permis de continuer la caractérisation des lymphocytes T DP. À cette fin, nous avons simplement ré-analysé les expériences précédentes en ignorant la présence de certains marquages dans l'analyse de ceux-ci. Nous avons déterminé que les lymphocytes T DP n'expriment pas le TCR $\gamma\delta$ ou α TCR (G); tous les lymphocytes T DP expriment le TCR $\alpha\beta$.

1.2 Proportion des lymphocytes T DP parmi les lymphocytes T.

Suite au développement de la stratégie de sélection complète des lymphocytes T DP, celle-ci fut appliquée à des PBMCs *ex-vivo* de 8 témoins sains et 12 patients non traités atteints de la SEP pour déterminer la fréquence de cette population lymphocytaire. Nous n'avons pas observé de différence dans la fréquence des lymphocytes T DP parmi les PBMCs des deux groupes se situant à un peu plus de 1% des lymphocytes T (figure 6H).

2.0 L'impact de l'IL-15 sur les lymphocytes T DP.

2.1 Expression des sous-unités du récepteur de l'IL-15 par les lymphocytes T.

Dans le but de déterminer si les lymphocytes T DP avaient le potentiel d'être ciblés par les actions de l'IL-15, nous avons tout d'abord évalué l'expression de son récepteur composé des deux sous-unités CD122 et CD132. Cette évaluation a été faite par cytométrie sur des

PBMCs *ex-vivo* obtenus de patients atteints de la SEP et de témoins sains marqués pour CD14, CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD56, CD122 et CD132.

Afin de s'assurer de la spécificité des marquages et des compensations appliquées lors de l'acquisition des résultats pour le marquage de CD122 et CD132, un contrôle FMO a été effectué. Il s'agit d'une série de marquages de PBMCs *ex-vivo* d'intérêt: CD14, CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD56, CD122 et CD132 puis, du retrait de CD122 et/ou CD132 et des contrôles isotopiques s'y rapportant. En bref, 5 marquages ont été effectués en parallèle contenant tous les anticorps centraux, mais où les anticorps de CD122 et CD132 ont été ajoutés, soustraits ou remplacés par leurs isotopes correspondant. Le tout est présenté à la figure (7) et démontre la spécificité du marquage et de l'utilisation de compensations adéquates.

Suivant la validation du marquage, l'expression du récepteur de l'IL-15 a été évaluée sur des échantillons provenant de 8 donneurs sains et 13 patients atteints de la SEP. L'expression du récepteur était significativement différente entre les sous-populations des lymphocytes T observées autant chez les patients que chez les témoins. Les lymphocytes T DP étaient ceux qui exprimaient le plus de récepteurs à un niveau avoisinant les 20% et ce, pour les deux groupes de donneurs. Les lymphocytes T CD8 représentaient la deuxième population exprimant davantage les chaînes du récepteur. Il était possible d'observer, sans qu'elle soit significative, une légère augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-15 chez lymphocytes T CD8 des patients (12%) comparativement aux témoins sains (7%); notre groupe a déjà rapporté des tels niveaux similaires entre ces deux groupes (Schneider et al. 2011). Quant aux lymphocytes T CD4, moins de 3% de ceux-ci exprimaient le récepteur et ce faible taux était significativement réduit par rapport aux lymphocytes T CD8 ou DP. Par contre, la comparaison des résultats entre les patients et les témoins a permis de constater qu'il n'y a pas de différence significative entre les sous-populations de lymphocytes T correspondantes (figure 8) entre les deux groupes de donneurs.

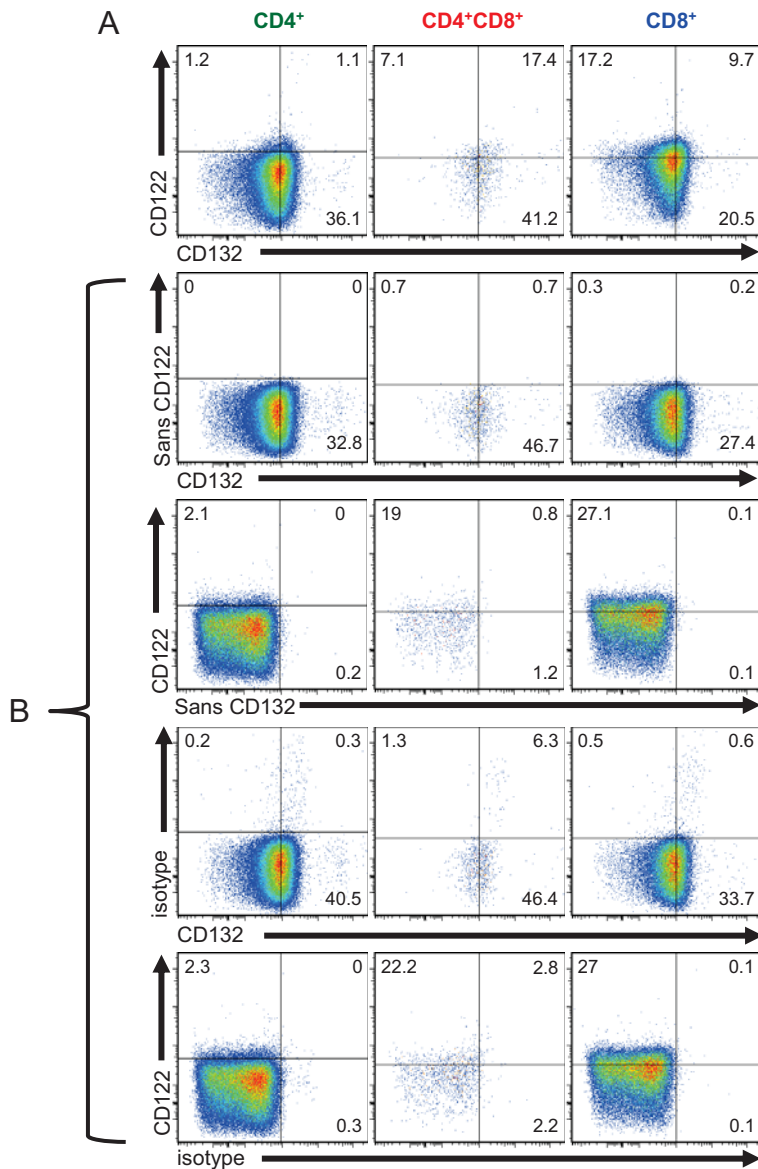


Figure 7: Expression *ex-vivo* des deux chaînes du récepteur de l'IL-15 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains.

Un exemple représentatif du marquage obtenu de PBMCs d'un donneur sain pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD56 et les deux sous unités du récepteur de l'IL-15 (CD122 et CD132) pour les populations CD4, CD4CD8 et CD8. A) Les résultats du marquage est illustré. B) Les différentes combinaisons des tests FMO sont illustrés. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques.

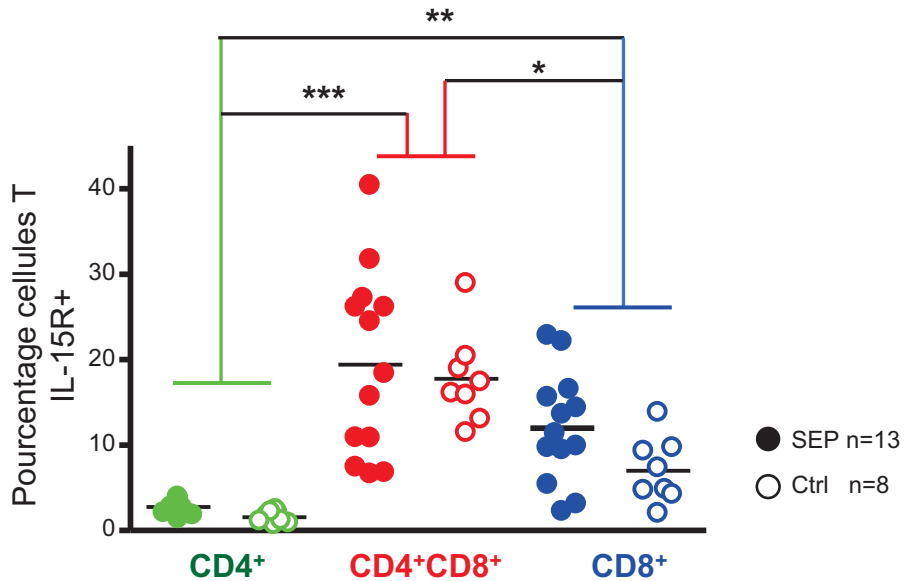


Figure 8: Expression *ex-vivo* des deux chaînes du récepteur de l'IL-15 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains.

Des PBMCs ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD56 et les deux sous unités du récepteur de l'IL-15 (CD122 et CD132) puis, analysés par cytométrie. Les proportions de lymphocytes T CD4, CD4CD8 et CD8 exprimant les deux sous-unités ont été déterminées chez des donneurs sains (n=8) et des patients non traités atteints de la SEP (n=13). Chaque point représente un donneur différent. Test d'analyse de variance (ANOVA) CD4 vs. CD8 SEP et Ctrl $p < 0.01$; CD4 vs. CD4CD8 SEP et Ctrl $p < 0.001$, CD4CD8 vs. CD8 SEP $p < 0.05$; CD4CD8 vs. CD8 SEP $p < 0.001$; SEP vs. Ctrl non significatif. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

2.2 Cinétique de la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-15 et l'IL-2.

Afin d'évaluer la capacité des différentes populations lymphocytaires à répondre à l'IL-15, nous avons déterminé quel pourcentage de ces cellules pouvaient répondre à une stimulation par l'IL-15 en déterminant la phosphorylation de STAT5, une molécule utilisée dans la transduction du signal d'activation induit par l'IL-15 (Mishra et al. 2014). De plus, comme les sous-unités du récepteur de l'IL-15 sont partagées avec l'IL-2, une stimulation à l'aide de l'IL-2 a été effectuée en parallèle afin de comparer les réponses induites par les deux cytokines. Les PBMCs de 5 donneurs sains ont été stimulées en parallèle par l'IL-15 (1ng/ml) ou l'IL-2 (1000U/ml). La cinétique a été effectuée pour chacune des deux cytokines avec des temps d'arrêt situés à 0, 5, 10, 15, 30, 60 et 90 minutes. Les PBMCs ont été marquées pour détecter les molécules suivantes: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, STAT3p et STAT5p puis, analysées par cytométrie. Le marquage de CD45RA et CD45RO a été utilisé pour permettre la différenciation des cellules naïves et mémoires (Berard and Tough 2002) lors de la réponse des cellules face à la stimulation de l'IL-15 ou l'IL-2. Un exemple représentatif de chaque condition de marquage est illustré à la figure 9.

L'exposition à l'IL-15 ou l'IL-2 a induit la phosphorylation de STAT5 d'une proportion des lymphocytes T DP, CD4 ou CD8 mémoires (figure 10). L'analyse des résultats de la figure 10A de la stimulation à l'IL-15 de tous les donneurs, nous permet de déterminer que ce sont les lymphocytes T DP qui possédaient l'activation de base la plus importante par la phosphorylation de STAT avoisinant les 15%; seulement 2 à 4% des autres lymphocytes T expriment des STATs phosphorylés au départ. Les lymphocytes T DP atteignaient une réponse maximale après cinq minutes d'exposition à l'IL-15 représentant près de 36% de ceux-ci. Les lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires atteignaient leurs pics à 15 minutes avec une réponse de 18% et de 15% respectivement. Les lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs ont eu une réponse à l'IL-15 négligeable. Suivant leurs pics, la réponse des lymphocytes T DP était restée stable pour ne diminuer que légèrement entre 60 et 90 minutes. Les lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires ont eu une courbe de réponse très similaire et ont tous deux diminués de façon constante après 15 minutes.

Nous pouvons observer à la figure 10B que la stimulation à l'IL-2 a induit la phosphorylation de STAT5 dans une plus grande proportion (plus de 50%) des lymphocytes T DP après 15 minutes; cette proportion n'a que très peu diminuée par la suite. La réponse maximale des lymphocytes T CD4 mémoires à l'IL-2 a été atteinte à 60 minutes (43%) mais une grande proportion de ceux-ci ont déjà répondu après 15 minutes de stimulation (38%). Environ 11% des lymphocytes T CD4 naïfs ont répondu à la stimulation avec l'IL-2 avec un maximum atteint après 15 minutes. Les lymphocytes T CD8 naïfs et CD8 mémoires ont tout deux eu une réponse maximale à 60 minutes (17% et 33%) mais avaient déjà une réponse importante après 15 minutes (12% et 27%) de stimulation. Un tableau récapitulatif des différences statistiques observées entre les lymphocytes T DP et les autres populations lymphocytaires est disponible en annexe pour l'IL-2 ainsi que pour l'IL-15 (tableau V et VI).

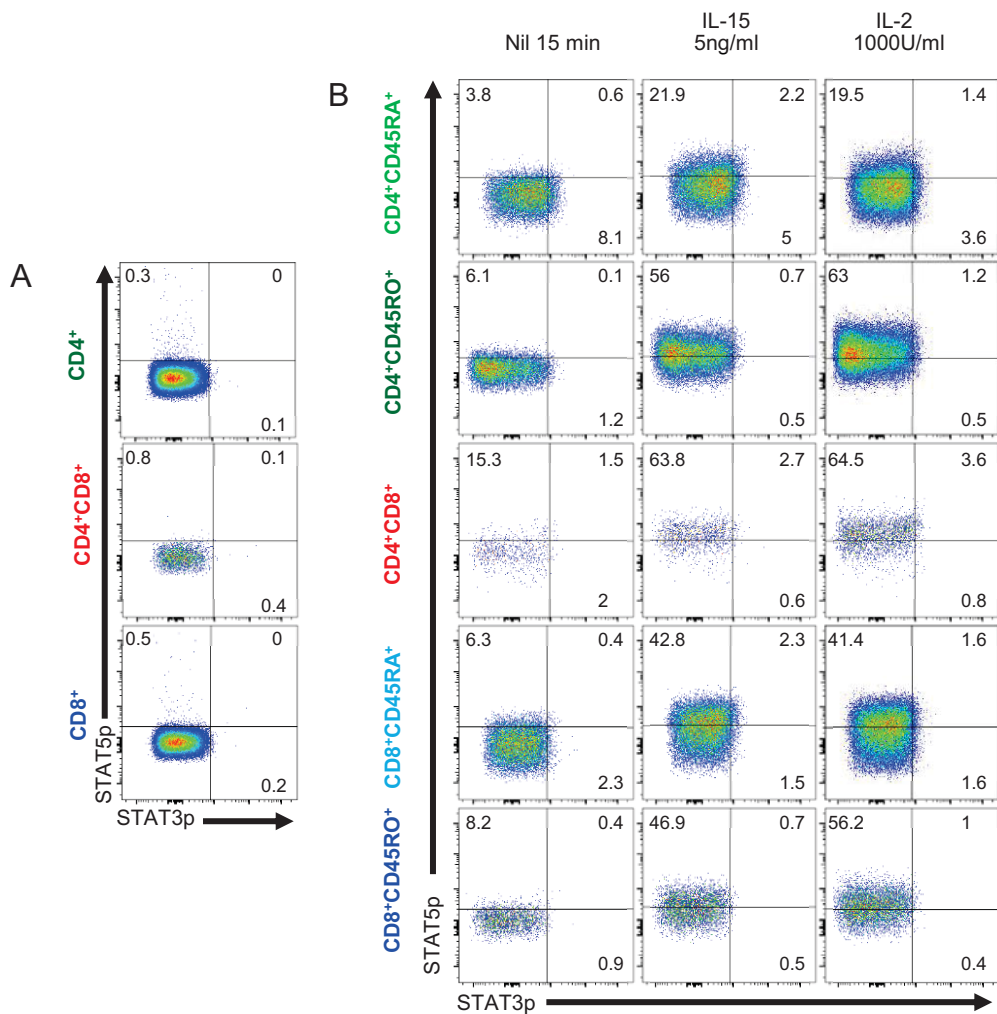


Figure 9: Détection de STAT5p sur les lymphocytes T.

Des PBMCs ont été traités avec l'IL-15 ou l'IL-2 puis marquées pour les molécules suivantes: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, STAT3p et STAT5p et analysées par cytométrie pour les populations T CD4 et CD8 naïves et mémoires ainsi que les DP. A) Les résultats d'un contrôle isotypique sont illustrés. B) Les résultats obtenus pour un donneur sain sont illustrés en absence de cytokine ou avec un traitement de 5ng/ml d'IL-15 et 1000U/ml d'IL-2. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques.

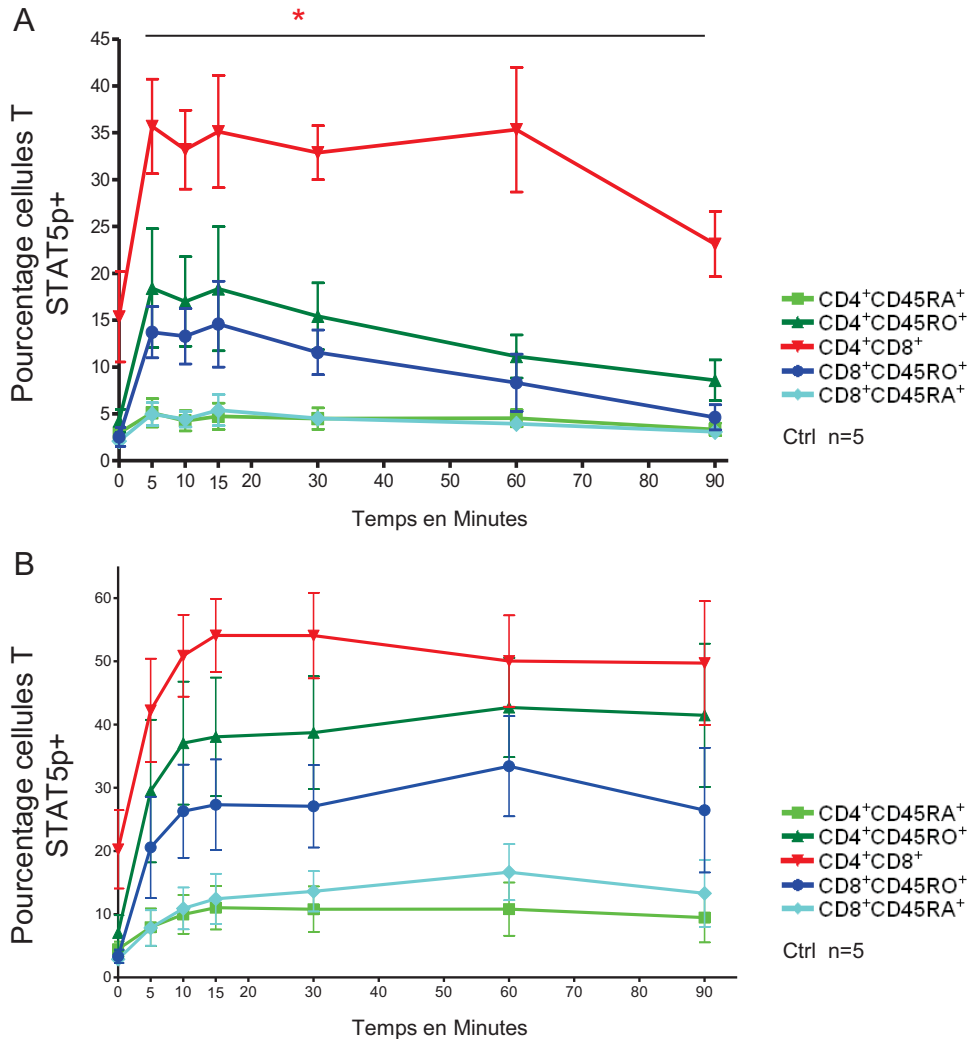


Figure 10: Pourcentages de cellules T positives pour STAT5p suite à une cinétique.

Les PBMCs ont été traités avec 5ng/ml d'IL-15 ou 1000U/ml d'IL-2 pour 0, 5, 10, 15, 30, 60 ou 90 minutes avant d'être marqués pour les molécules suivantes: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, STAT5p et STAT3p puis, analysés par cytométrie. A) Les proportions de lymphocytes T CD4CD45RA, CD4CD45RO, CD8CD45RA, CD8CD45RO et CD4CD8 exprimant STAT5p en réponse à l'IL-15 ont été déterminées pour 5 donneurs sains. B) Les proportions de lymphocytes T CD4CD45RA, CD4CD45RO, CD8CD45RA, CD8CD45RO et CD4CD8 exprimant STAT5p en réponse à l'IL-2 ont été déterminées pour 5 donneurs sains. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques. Les moyennes +/- les SEM sont illustrées. Test d'analyse de variance (ANOVA) où CD4CD8 vs. toutes sous-populations confondu $p \leq 0.05$. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

2.3 Dose-réponse de la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-15 et l'IL-2.

Des travaux préalablement effectués dans notre laboratoire ont établi que les cellules T CD8 des patients atteints de la SEP répondent à des doses plus faibles d'IL-15 que les cellules obtenues des donneurs sains (Schneider et al. 2011). L'établissement d'une courbe dose-réponse constituait donc une suite logique à notre projet dans le but d'étudier l'impact de l'IL-15 sur l'activation des sous-populations lymphocytaires. Le temps de stimulation optimal ayant été préalablement établi à 15 minutes, une série de stimulations à l'aide de doses variables d'IL-15 et d'IL-2 a été effectuée dans le but de déterminer la sensibilité de chacune des sous-populations lymphocytaires étudiées.

Les PBMCs de 6 donneurs sains ont été stimulées à l'aide de différentes doses de l'IL-15 (0.2 à 5ng/ml) ou de l'IL-2 (50 à 1000U/ml) pendant 15 minutes (figure 11). Les résultats de la dose-réponse nous indiquent qu'une plus grande proportion de lymphocytes T DP a répondu à toutes les doses d'IL-15 testées. Les lymphocytes T mémoires CD4 et CD8 ont suivi une courbe de réponse similaire et ont répondu plus fortement que les lymphocytes T naïfs au-delà d'une concentration 0.6ng/ml d'IL-15. L'IL-15 a induit l'expression de STAT5p dans une proportion plus modeste des lymphocytes T naïfs, particulièrement les cellules T CD4, comparativement aux lymphocytes T mémoires et ce, à toutes les doses testées.

Les réponses induites par les différentes doses d'IL-2 ont été différentes de celles induites par l'IL-15 (figure 11B). L'IL-2 a induit un plus grand pourcentage de phosphorylation de STAT5 dans les populations de lymphocytes T CD4 mémoires et DP; ces deux populations ont des profils de réponses très similaires et ce, à toutes les doses testées. La proportion des lymphocytes T CD8 mémoires qui a répondu à l'IL-2 a été intermédiaire (inférieure aux lymphocytes T CD4 mémoires et DP). Finalement, une faible proportion de lymphocytes T CD8 naïfs a répondu à l'IL-2 alors qu'une proportion négligeable de lymphocytes T CD4 naïfs exprime la forme phosphorylée de STAT5 en réponse à l'IL-2 à toutes les concentrations testées. Un tableau récapitulatif des différences statistiques observées entre les lymphocytes T DP et les autres populations lymphocytaires est disponible en annexe pour l'IL-2 ainsi que pour l'IL-15 (tableaux VII et VIII).

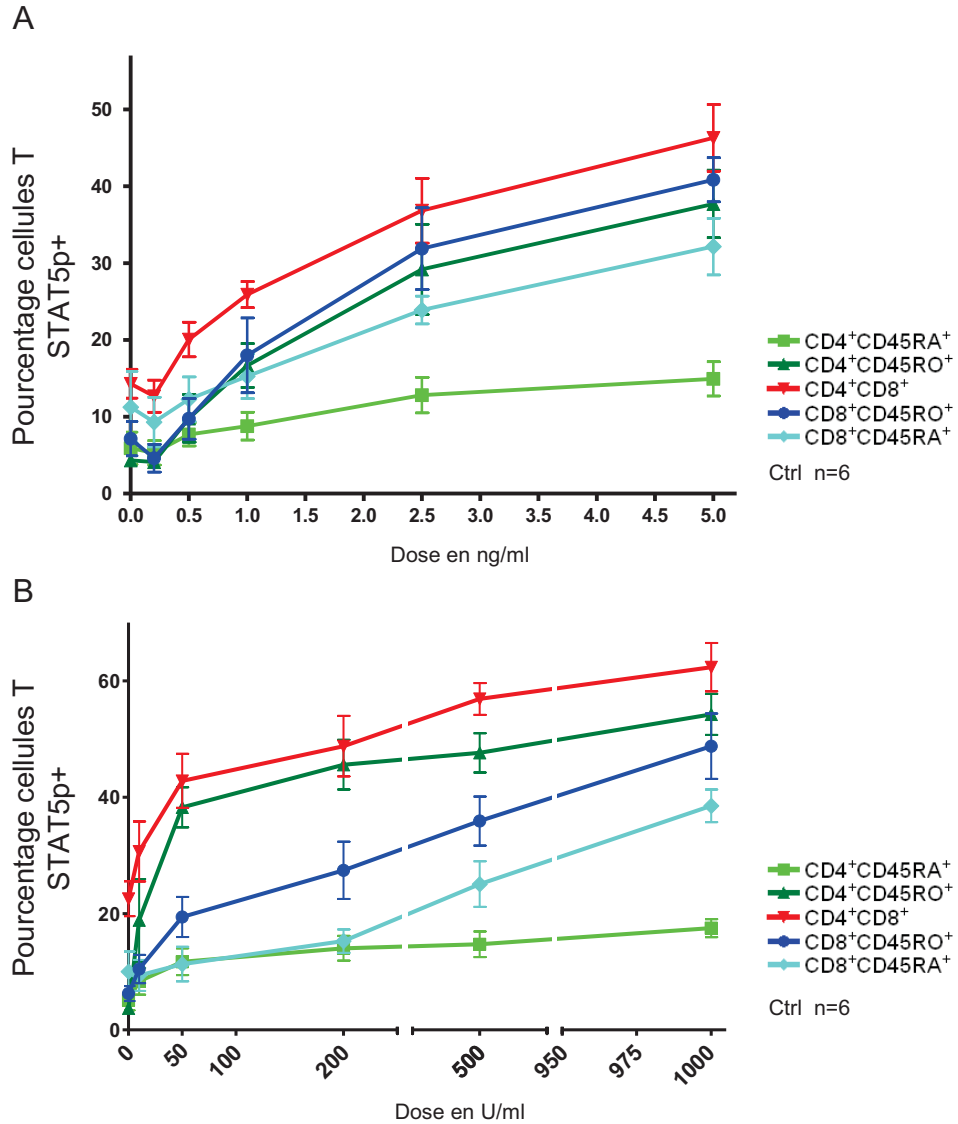


Figure 11: Pourcentages de cellules T positives pour STAT5p suite à une dose/réponse. Les PBMCs ont été stimulés avec des doses variables d'IL-15 (0.2, 0.6, 1, 2.5 et 5ng/ml) ou d'IL-2 (10, 50, 200, 500 et 1000U/ml) sur une période de 15 minutes puis ont été marqués pour les molécules suivantes: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, STAT5p et STAT3p et analysés par cytométrie. A) Les proportions de lymphocytes T CD4CD45RA, CD4CD45RO, CD8CD45RA, CD8CD45RO et CD4CD8 exprimant STAT5p suite à l'exposition de différentes doses d'IL-15 ont été déterminées pour 6 donneurs sains. B) Les proportions de lymphocytes T CD4CD45RA, CD4CD45RO, CD8CD45RA, CD8CD45RO et CD4CD8 exprimant STAT5p suite à l'exposition de différentes doses d'IL-2 ont été déterminées pour 6 donneurs sains. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques. Les moyennes +/- les SEM sont illustrées. Test d'analyse de variance (ANOVA) ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05

3.0 Profil d'expression des lymphocytes T suite à une activation

Les lymphocytes T du système immunitaire sont généralement classés selon leur capacité à produire certains médiateurs. Nous avons voulu déterminer le profil d'expression des lymphocytes T DP *ex-vivo* suite à une activation afin de déterminer quelles fonctions pourraient leur être attribuées dans la ségrégation classique Th1/Tc1 Th2/Tc2 Th17/Tc17 : c'est-à-dire l'expression des cytokines signatures : IFN- γ , IL-4 et IL-17a. En second lieu, nous avons voulu déterminer leur potentiel cytotoxique par l'expression des enzymes telles que la perforine et le granzyme B. En troisième lieu, nous avons voulu explorer l'expression de quelques autres cytokines et enzymes afin de déterminer lesquelles seraient les plus prometteuses pour la suite de cette étude.

3.1 Profil d'expression des cytokines signatures suite à une activation

Dans le but de déterminer le profil des sécrétions des cytokines par les lymphocytes T DP, des PBMCs de donneurs sains et de patients atteints de la SEP ont été activées à l'aide d'un mélange composé de PMA, d'ionomycine et de brefeldin A pour une période de 5 h et ont été ensuite marqués à l'aide de deux mélanges d'anticorps. Le premier, contenant les marqueurs pour CD14, CD3, CD4, CD8, IL-4, IFN- γ et IL-17a afin de déterminer leurs profils Th1/Tc1 Th2/Tc2 Th17/Tc17. Le deuxième, contenant les marqueurs pour CD14, CD3, CD4, CD8, granzyme B, IFN- γ et perforine pour déterminer leurs potentiels cytotoxiques. La présence de l'IFN- γ dans les deux mélanges a servi de contrôle interne entre les marquages effectués en parallèle. Un contrôle isotopique a été effectué pour chaque donneur et chaque mélange afin de prendre en considération la variation possible inter donneurs. Un exemple de résultat de marquage pour chacun des mélanges d'anticorps est illustré aux figures 12 et 13. Les résultats présentés à la figure 14 correspondent à une analyse entre les patients atteints de la SEP et les témoins sains avec la présentation des différences significatives obtenues entre les populations de lymphocytes T DP des patients atteints de la SEP et des témoins sains.

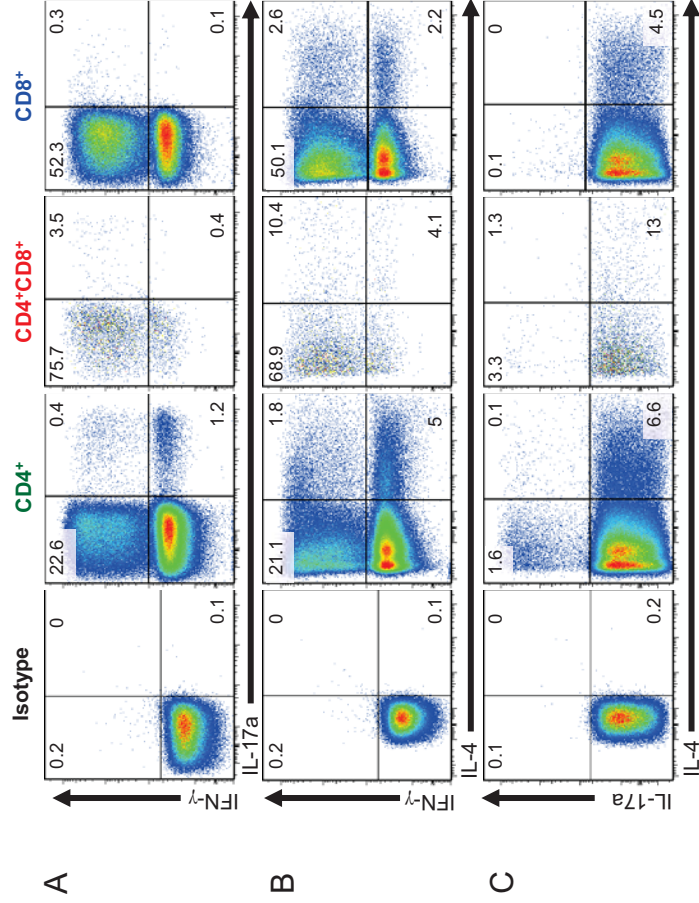


Figure 12: Détection des cytokines signatures des sous-populations Th1, Th2 et Th17. Les PBMCs d'un donneur sain ont été traités pendant 5h en présence de PMA+ionomycine+brefeldin A puis, marqués pour les molécules d'intérêts: CD3, CD4, CD8, IL-4, IL-17a et IFN-γ puis, analysés par cytométrie pour les populations CD4, CD4CD8 et CD8. Représentation d'un résultat typique obtenu d'un donneur sain. A) Expression d'IFN-γ vs. IL-17a. B) Expression d'IFN-γ vs. IL-4. C) Expression d'IL-17a vs. IL-4. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques à partir des cellules CD3 positives.

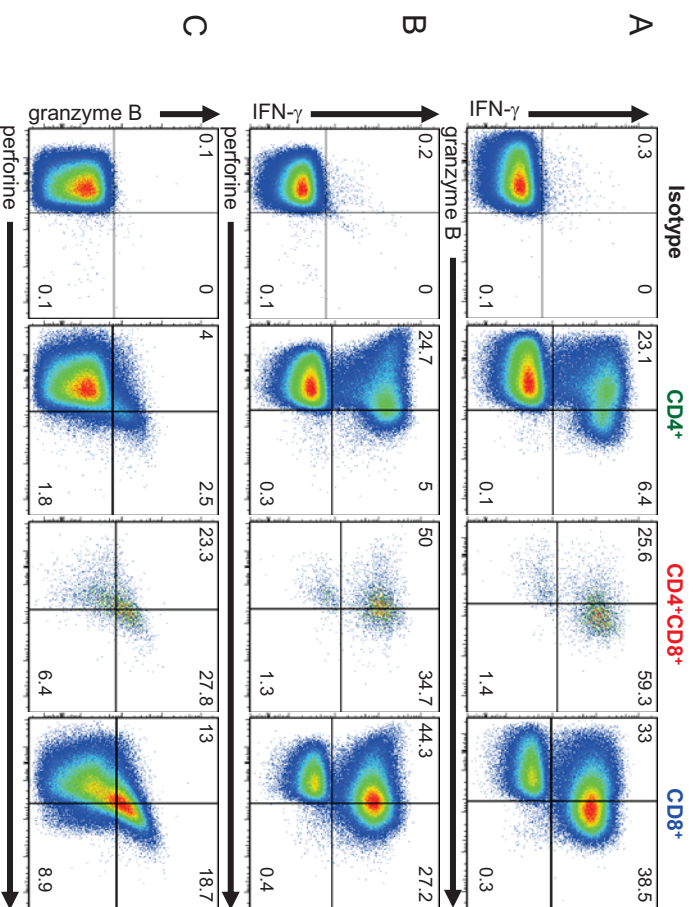


Figure 13: Détection des enzymes cytotoxiques.

Les PBMCs d'un donneur sain ont été traités pendant 5h en présence de PMA+ionomycine+brefeldin A puis, marqués pour les molécules d'intérêts: CD3, CD4, CD8, granzyme B, perforine et IFN- γ puis, analysés par cytométrie pour les populations CD4, CD4CD8 et CD8. Représentation d'un résultat typique obtenu d'un donneur sain. A) Expression d'IFN- γ vs. granzyme B. B) Expression d'IFN- γ vs. perforine. C) Expression de Granzyme B vs. Perforine. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques à partir des cellules CD3 positives.

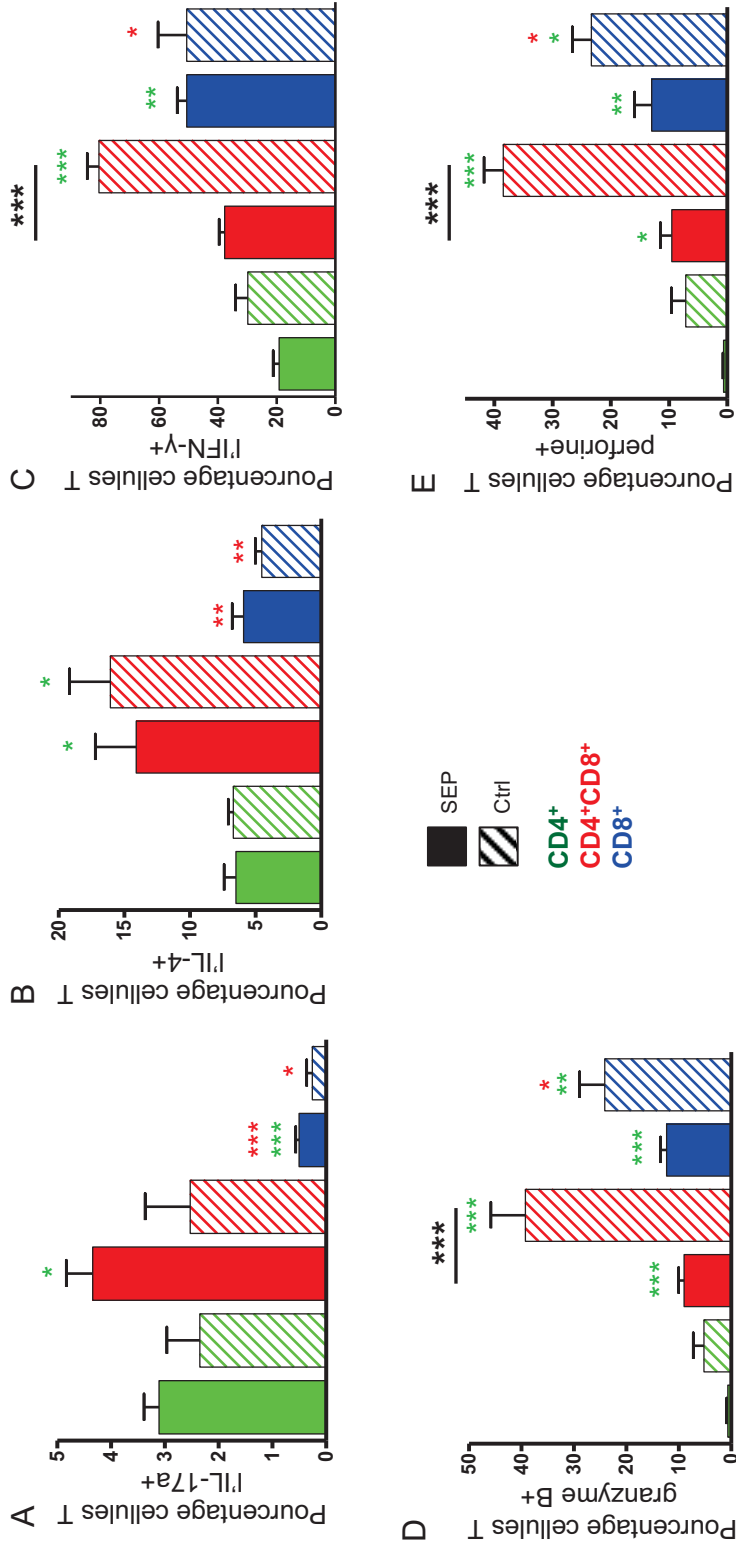


Figure 14: Caractérisation de l'expression de différentes cytokines et enzymes par les lymphocytes T. Les PBMCs de 6 témoins sains et 6 ou 7 patients non-traités de la SEP ont été stimulés 5h en présence de PMA+inomycine+brefeldin A puis, marqués pour CD3, CD4, CD8, IL-4, IFN- γ , granzyme B et perforine avant d'être analysés par cytométrie pour les populations CD4, CD4CD8 et CD8. Les moyennes des pourcentages des cellules exprimant les molécules d'intérêts +/- les SEM sont illustrées. A) l'IL-17a, B) l'IL-4, C) l'IFN- γ , D) granzyme B et E) perforine. Analyse statistique : CD4CD8 des patients SEP versus témoins sains. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques. Test d'analyse de variance (ANOVA). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Pour IL-17a, IL-4 : Pas de différences significatives entre les SEP et Ctrl
 Pour IFN- γ , granzyme B et perforine: CD4CD8: SEP vs. Ctrl *** $p < 0.001$ (étoiles noires)
 Pour les comparaisons entre les populations au sein des mêmes donneurs si les différences sont significatives:
 Comparaison CD4 vs. CD4CD8 ou CD8: des étoiles vertes sont indiquées au dessus des colonnes CD4CD8 ou CD8
 CD4CD8 vs. CD8: des étoiles rouges sont indiquées au dessus des colonnes CD8

L'évaluation du 1^{er} mélange (Th1/Tc1 Th2/Tc2 Th17/Tc17) chez les témoins sains (figure 14) a permis d'observer un niveau significativement plus élevé pour l'IFN- γ et l'IL-4 chez les lymphocytes T DP comparativement aux autres sous-populations (CD4 ou CD8). En effet, les pourcentages de cellules produisant de l'IFN- γ étaient significativement plus élevés chez les lymphocytes T DP (près de 80%) suivi des lymphocytes T CD8 (50%) et enfin des lymphocytes T CD4 (30%). Les niveaux d'IL-4 étaient inférieurs à ceux de l'IFN- γ pour toutes les populations lymphocytaires toutefois, la proportion de lymphocytes T DP exprimant cette cytokine était significativement supérieure (16%) à celles des lymphocytes T CD4 (6,7%) et CD8 (4,5%). Le pourcentage de lymphocytes T DP (2,5%) et de lymphocytes T CD4 (2,3%) qui exprimait l'IL-17a était similaire et ceux-ci étaient supérieurs à celui des lymphocytes T CD8 (moins de 0,3%). Par ailleurs, la différence de production d'IL-17a entre les lymphocytes T DP et CD8 s'est avérée significative.

L'évaluation de la production de ces cytokines signatures chez les patients atteints de la SEP (figures 14) a révélé que les proportions de lymphocytes T qui produisaient de l'IFN- γ étaient significativement différentes entre les lymphocytes T CD4 et les CD8, les lymphocytes T CD8 étant supérieurs. Aucune différence significative n'a été observée pour les lymphocytes T DP. La production d'IL-4 était similaire à celle observée chez les donneurs sains c'est-à-dire, plus élevée chez les lymphocytes T DP suivi d'un niveau similaire entre les lymphocytes T CD4 et CD8. Une différence significative a été observée pour l'IL-17a entre toutes les sous-populations de lymphocytes T; les proportions étaient plus élevées chez les lymphocytes T DP suivi des lymphocytes T CD4 par rapport aux lymphocytes T CD8. La comparaison entre les donneurs sains et les patients atteints de la SEP (figure 14) a démontré que la proportion de lymphocytes T DP produisant de l'IFN- γ était supérieure chez les donneurs sains comparativement aux patients atteints de la SEP. Les observations pour les autres cytokines (l'IL-14 et l'IL-17a) étaient similaires pour les deux groupes de donneurs pour les lymphocytes T DP.

3.1 Profil d'expression des enzymes lytiques suite à une activation

L'évaluation du 2^e mélange (cytotoxique) sur des échantillons de donneurs sains (figure 14) a révélé des proportions significativement plus élevées de lymphocytes T DP positifs pour la perforine et le granzyme B comparativement aux autres sous-populations (près de 38%). De plus, un plus grand pourcentage de lymphocytes T CD8 (un peu plus de 23%) produisait ces enzymes lytiques comparativement aux lymphocytes T CD4 (environ 7%). Toutefois, la même analyse sur des échantillons provenant de patients atteints de la SEP a démontré que légèrement plus de lymphocytes T CD8 étaient positifs pour la perforine et le granzyme B que les lymphocytes DP mais sans différence significative entre les deux. Ces niveaux étaient par contre significativement plus élevés chez les lymphocytes T CD8 et DP que chez les lymphocytes T CD4 (moins de 1%). Le pourcentage des lymphocytes T DP produisant des enzymes lytiques (perforine et granzyme B) était significativement inférieur chez les patients atteints de la SEP à celui détecté chez les donneurs sains.

3.3 Expression de diverses cytokines par les lymphocytes T DP

Afin d'élargir la caractérisation des lymphocytes T DP, nous avons, de façon préliminaire, testé d'autres cytokines (GM-CSF, IL-5, IL-21, TNF) et enzyme (granzyme A) suite à l'activation de PBMCs d'un donneur sain. Il s'agit de cytokines dont la production a préalablement été rapporté parmi les DP (Desfrancois et al. 2010) en plus qu'une variation de leurs concentrations dans le sérum des patients a été observées (Kanabrocki et al. 2007). Les résultats préliminaires obtenus permettent d'observer un profil d'expression de cytokines des lymphocytes T DP qui semble distinct des lymphocytes T CD4 et CD8 dont les résultats sont présentés à la figure 15. Les proportions de lymphocytes T DP qui ont produit du GM-CSF (une cytokine associée au profile Th1 et Th17), du TNF (cytokine associé au profile Th1) et du granzyme A ont été supérieures à celles observées chez les populations de lymphocytes T CD8 et CD4. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si de tels résultats sont observables chez plusieurs donneurs.

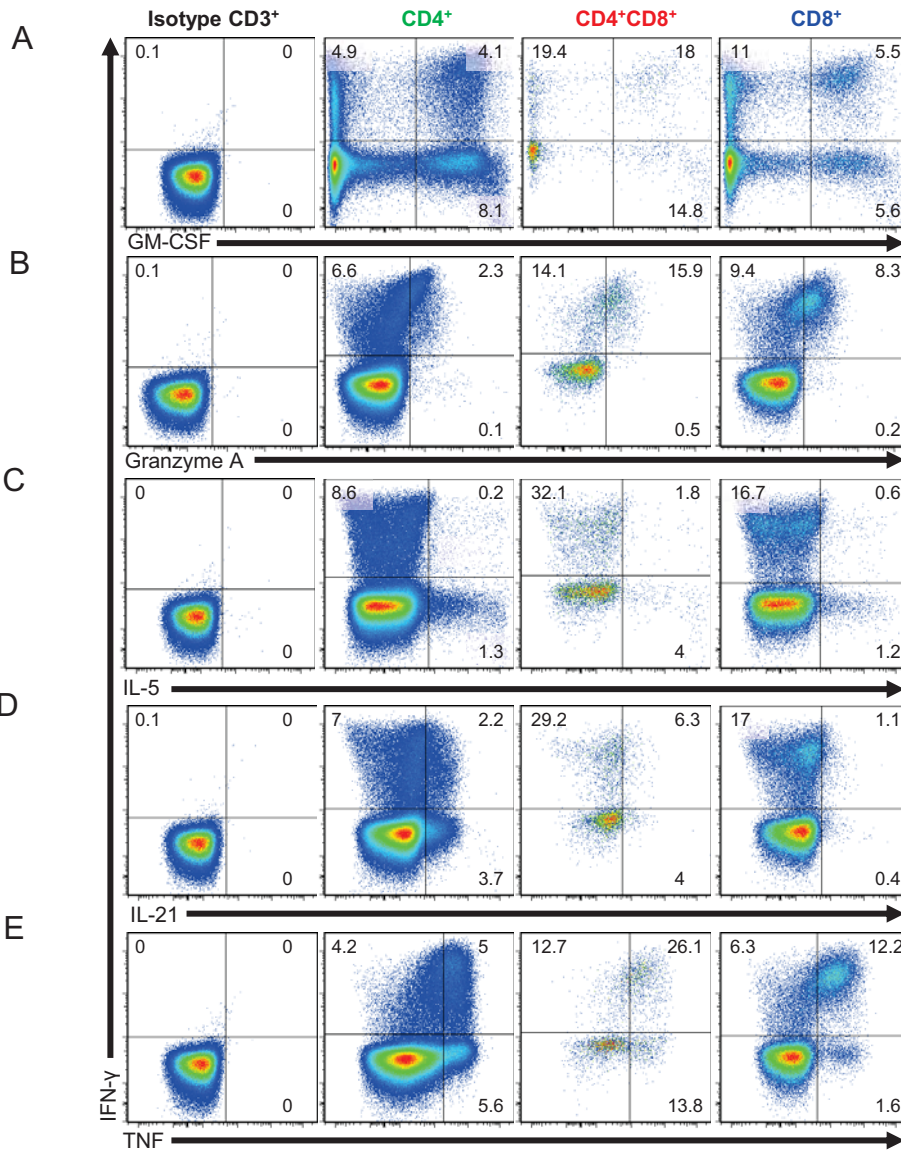


Figure 15: Cytokines produites par les lymphocytes T CD4⁺CD8⁺.

Les PBMCs d'un donneur sain ont été traités pendant 5h en présence de PMA+inomyicine+brefeldin A puis marqués pour les molécules suivantes: CD3, CD4, CD8, GM-CSF, Granzyme A, IL-4, IL-5, IL-21, TNF et IFN-γ et analysés par cytométrie pour les populations CD4, CD4CD8 et CD8. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques. A) Expression d'IFN-γ vs GM-CSF B) Expression d'IFN-γ vs granzyme A. C) Expression d'IFN-γ vs IL-5. D) Expression d'IFN-γ vs IL-21. E) Expression d'IFN-γ vs TNF.

4.0 Caractérisation phénotypique des lymphocytes T DP

Afin de poursuivre la caractérisation des lymphocytes T DP, nous avons ciblé une série de marqueurs possiblement impliqués dans la SEP, en lien avec les résultats que nous avons préalablement obtenus. Nous avons voulu déterminer l'état d'activation, de sénescence et du potentiel migratoire des lymphocytes T DP à l'aide de marqueurs tels que le CCR7 (Noor and Wilson 2012), le CXCR3 (Groom and Luster 2011), le CD57 (Ratts et al. 2006) et le CD95 (Moreno et al. 2014). Nous avons aussi évalué l'expression de PD1 ainsi que de ses deux ligands pour déterminer si les lymphocytes T DP ont le potentiel d'exercer ou de subir une modulation immunitaire par l'action de PD1 et de ses ligands (Dai et al. 2014). Nous avons évalué l'expression du NKG2D par les lymphocytes T DP en lien avec les intérêts de notre équipe pour cette molécule dans la SEP (Saikali et al. 2007). Nous avons ensuite évalué la double expression de CD161 et CCR6 par les lymphocytes T DP en lien avec le rôle pathogénique proposé pour les lymphocytes T CD8 exprimant ces marqueurs dans la SEP (Annibali et al. 2011). Rappelons aussi les lymphocytes T DP sont majoritairement CD45RO+ (Waschbisch et al. 2014) mais que pour des raisons techniques nous avons choisie de ne pas faire la distinction entre les DP CD45RA et CD45RO.

4.1 Expression de récepteurs de chimiokines

Afin d'obtenir des informations sur l'état d'activation des lymphocytes T DP, nous avons évalué l'expression de CXCR3 et CCR7, des récepteurs de chimiokines qui permettent d'évaluer l'état d'activation et le potentiel migratoire des lymphocytes T vers leurs sites respectifs. L'expression du premier est associé à l'activation ainsi qu'au potentiel migratoire des lymphocytes T vers leurs lieux d'actions (Groom and Luster 2011). L'expression du CCR7 est plutôt associée à la migration des lymphocytes vers les sites lymphatiques secondaires pour leur activation subséquente (Noor and Wilson 2012). À ceci, nous avons ajouté les marqueurs pour CD45RA et pour CD45RO pour différencier les lymphocytes naïfs et mémoires. Un exemple des données obtenues en cytométrie est illustré (figure 16). Les résultats compilés de 8 patients atteints de la SEP et de 13 donneurs sains pour l'évaluation de l'expression de CCR7 est illustré à la figure 17. Les résultats compilés de 3 patients atteints de

la SEP et de 6 donneurs sains pour l'évaluation de l'expression de CXCR3 est illustré à la figure 18.

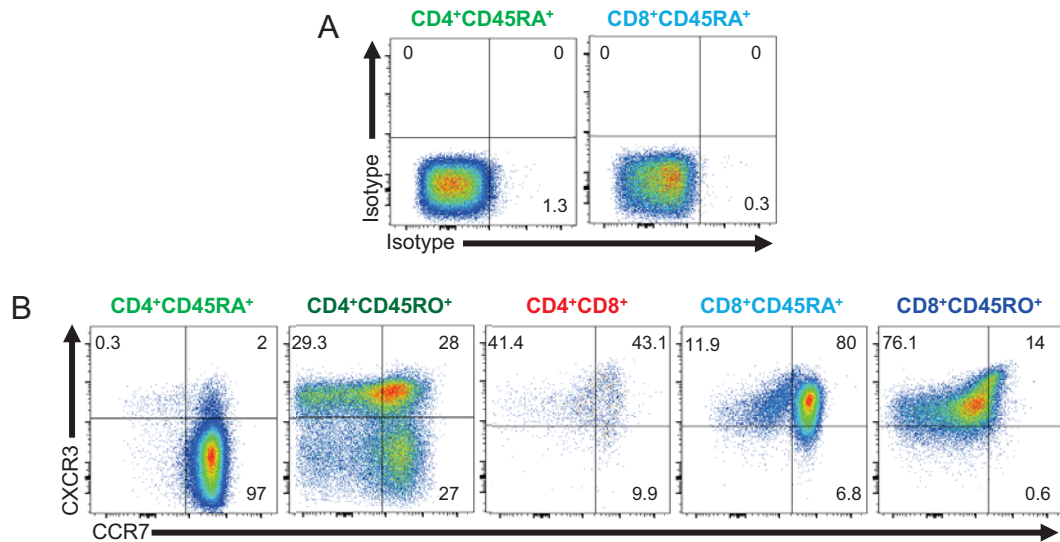


Figure 16: Expression *ex-vivo* des CCR7 et CXCR3 par les différentes sous-populations de lymphocytes T humains.

Des PBMCs d'un donneur sain ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CXCR3 et CCR7 puis, analysés par cytométrie pour les populations CD4, CD4CD8 et CD8. A) Les profils des contrôles isotypiques et B) des marquages sont illustrés pour chaque population lymphocytaire.

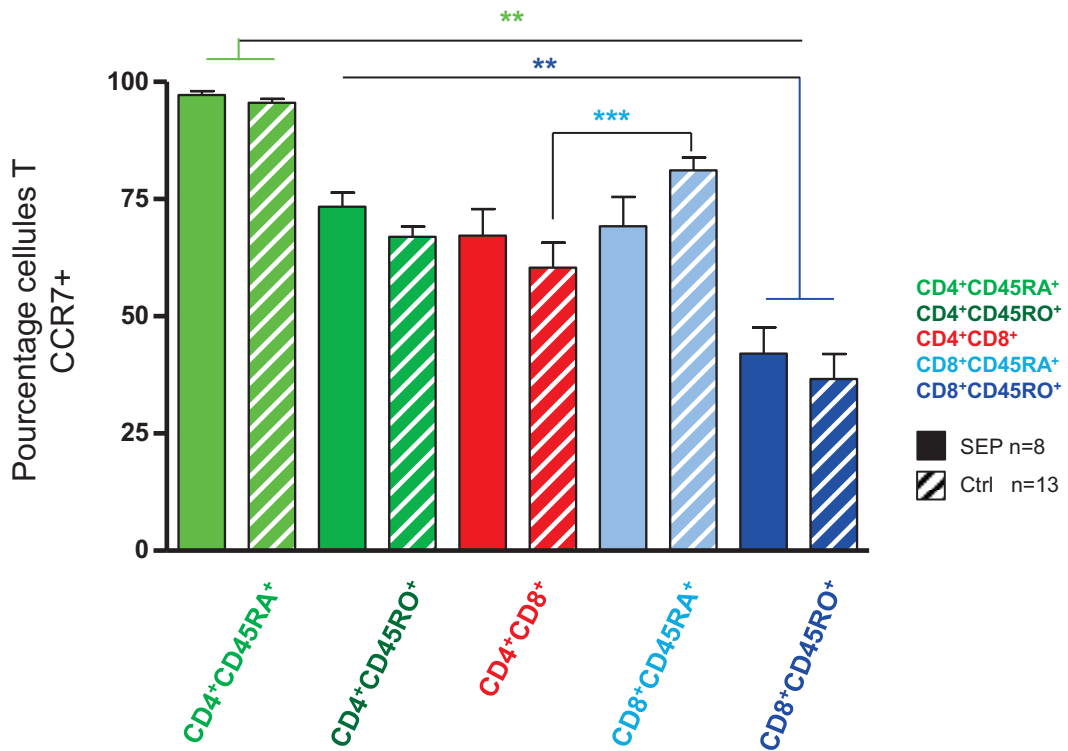


Figure 17: Expression *ex-vivo* de CCR7 par les différentes sous-populations de lymphocytes T humains.

Des PBMCs ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CXCR3 et CCR7 puis, analysés par cytométrie. Les proportions de lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs et mémoires ainsi que les DP exprimant CCR7 ont été déterminées chez des donneurs sains (n=13) et des patients non traités atteints de la SEP (n=8). Les moyennes +/- les SEM sont illustrées. Test d'analyse de variance (ANOVA) CD4CD45RA vs. toutes les autres populations SEP et Ctrl $p < 0.01$; CD8CD45RO vs. toutes les autres populations SEP et Ctrl $p < 0.01$; CD4CD8 vs. CD8CD45RA Ctrl $p < 0.001$; SEP vs. Ctrl non significatif. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

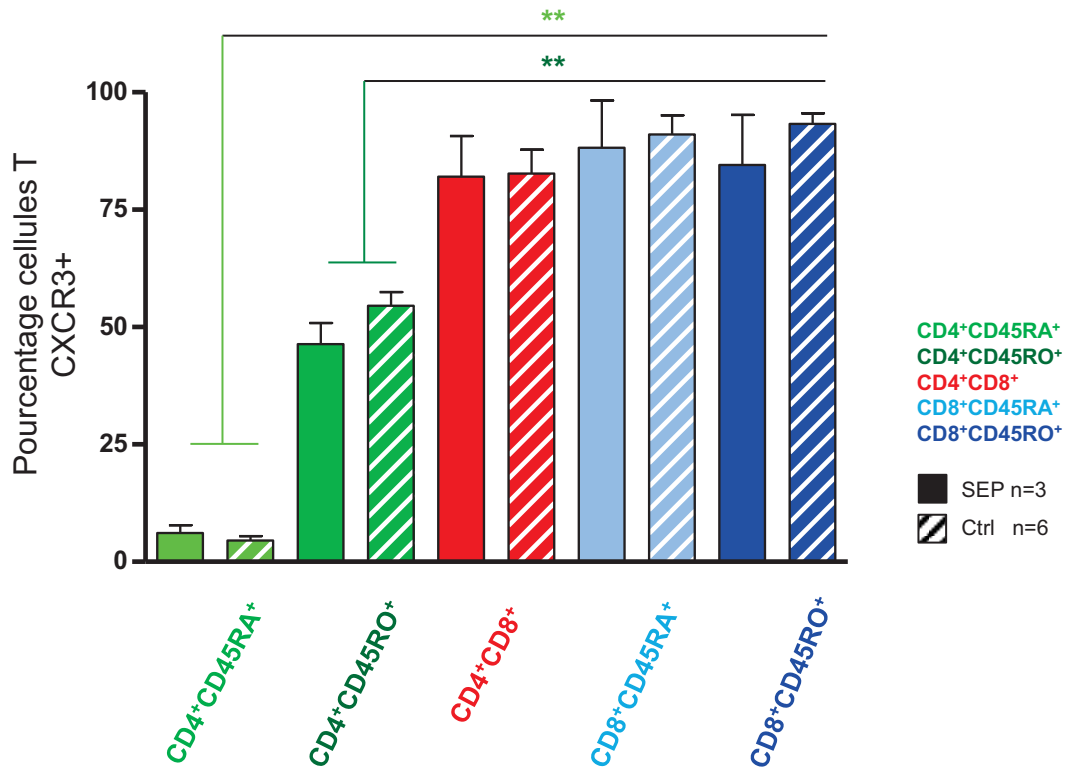


Figure 18: Expression *ex-vivo* de CXCR3 par les différentes sous-populations de lymphocytes T humains.

Des PBMCs ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CXCR3 et CCR7 puis, analysés par cytométrie. Les proportions de lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs et mémoires ainsi que les DP exprimant CXCR3 ont été déterminées chez des donneurs sains (n=6) et des patients non traités atteints de la SEP (n=3). Les moyennes +/- les SEM sont illustrées. Test d'analyse de variance (ANOVA) CD4CD45RA vs. les autres populations SEP et Ctrl $p < 0.01$; CD4CD45RO vs. les autres populations SEP et Ctrl $p < 0.01$; SEP vs. Ctrl non significatif. ** $p < 0.01$.

L'analyse de l'expression de CCR7 par les lymphocytes T des patients atteints de la SEP (figure 17) révèle que près de la totalité des lymphocytes T CD4 naïfs étaient positifs et ce, à un niveau significativement plus élevé que les autres sous-populations de lymphocytes T. Les lymphocytes T CD4 mémoires, DP et CD8 naïfs partageaient un niveau d'expression similaire du CCR7 qui était située entre 67% et 73%. L'expression du CCR7 par les lymphocytes T CD8 mémoires était significativement plus basse, soit autour de 42%. Les résultats de l'expression de CCR7 chez les donneurs sains ont été similaires à ceux obtenus chez les patients à l'exception des lymphocytes T CD8 naïfs qui étaient légèrement plus élevés que chez les patients atteints de la SEP. De plus, l'expression de CCR7 était significativement différente entre les lymphocytes T CD8 naïfs et lymphocytes T DP des donneurs sains. Nous n'avons toutefois pas observé de différences significatives entre les patients atteints de la SEP et les donneurs sains (figure 17).

L'analyse de l'expression de CXCR3 par les lymphocytes T des patients atteints de la SEP (figure 18) a révélé que les lymphocytes T CD4 naïfs n'exprimaient que très peu ce récepteur. Par contre, près de 46% des lymphocytes T CD4 mémoires exprimaient CXCR3. La proportion des lymphocytes T DP, CD8 naïfs et CD8 mémoires qui exprimait le CXCR3 était similaire, soit autour de 85%. Des différences significatives ont été observées entre les populations de lymphocytes T CD4 naïfs et CD4 mémoires et aussi entre ceux-ci et les lymphocytes T DP, CD8 naïfs et CD8 mémoires. Des résultats similaires ont été observés chez les donneurs sains (figure 18). Aucune différence significative n'a été observée pour l'expression de CXCR3 entre les patients atteints de la SEP et les donneurs sains (figure 18).

4.2 Expression *ex-vivo* de CD57 et CD95 par les lymphocytes T

Suite à l'observation de différences significatives dans le pourcentage des lymphocytes T DP pour l'IFN- γ , la perforine et granzyme B entre les patients atteints de la SEP et les donneurs sains, nous avons voulu déterminer si ce changement pouvait être dû à une activation chronique de ces cellules. Nous avons choisi de déterminer l'expression de CD57, car celle-ci a été associée à l'activation chronique des lymphocytes CD8 dans la SEP (Ratts et al. 2006). Le récepteur Fas ou CD95 est quant à lui associé à un récepteur de mort cellulaire programmée (Moreno et al. 2014). Un exemple des données obtenues en cytométrie est illustré

(figure 19A). Les PBMCs *ex-vivo* de 8 donneurs sains et de 5 patients atteints de la SEP ont été analysées pour l'expression de CD57 (figure 19B) et CD95 (figure 19C). Nous avons observé une variation inter-donneur relativement élevée pour l'expression de CD57 par les lymphocytes T DP, autant chez les donneurs sains que chez les patients atteints de la SEP (figure 19B). Chez les donneurs sains, la proportion de cellules exprimant le CD57 était plus élevée chez les lymphocytes T DP, suivi des lymphocytes T CD8, pour terminer avec les lymphocytes T CD4. De plus, la différence a été significative entre les lymphocytes T CD4 et DP. Chez les patients atteints de la SEP, les niveaux d'expression de CD57 étaient similaires entre les lymphocytes T DP et CD8 qui étaient tous deux significativement supérieurs aux lymphocytes T CD4. Aucune autre variation significative n'a été observée pour l'expression de CD57 entre les patients atteints de la SEP et les donneurs sains.

Lorsque nous évaluons l'expression de CD95 chez les donneurs sains (figure 19C), son expression était significativement plus élevée chez les lymphocytes T DP que chez les lymphocytes T CD4 et CD8, soit autour de 69% comparativement à 35% et 39%. L'expression de CD95 par les lymphocytes T CD4 et CD8 n'était pas significativement différente. L'évaluation de l'expression de CD95 chez les patients atteints de la SEP et les donneurs sains révèle une différence significative entre les lymphocytes T CD4 et DP. Une différence significative entre les lymphocytes T CD8 et DP a été observé chez les donneurs sains. Une augmentation de l'expression de CD95 a été observée entre les lymphocytes T CD8 des patients atteints de la SEP comparativement aux donneurs sains malgré la forte variation inter-donneur de celle-ci (figure 19C).

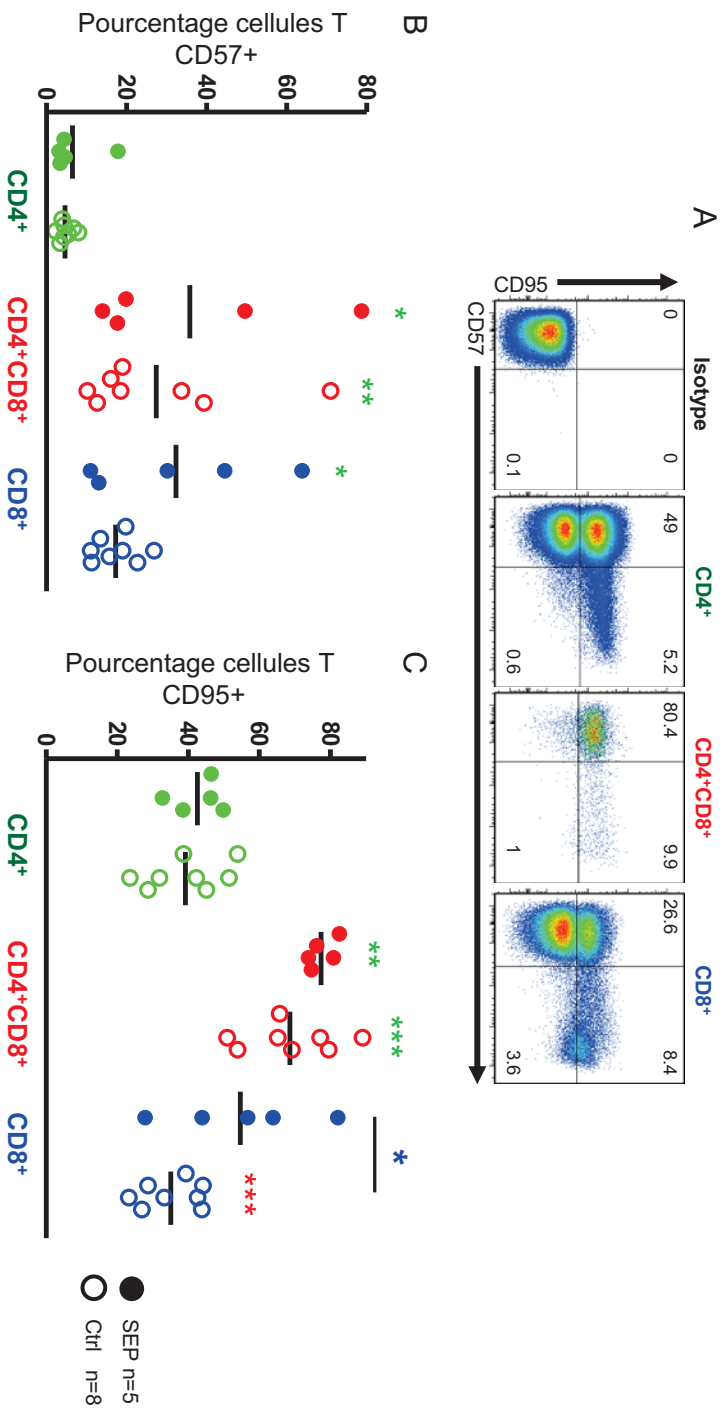


Figure 19: Expression *ex-vivo* des récepteurs CD57 ou CD95 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains. Des PBMCs ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD56, CD57 et CD95 puis, analysés par cytométrie pour les populations CD4, CD4CD8 et CD8 exprimant CD57 ou CD95. A) Les résultats obtenus pour un donneur sain sont illustrés. Les pourcentages de cellules positives pour CD57 (B) et CD95 (C) des PBMCs de 5 patients SEP non traités et de 8 donneurs sains sont illustrés, chaque point représente un donneur. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques à partir des cellules CD3 positives. Test d'analyse de variance (ANOVA). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Pour CD57: Pas de différences significatives entre les SEP et Ctrl; pour CD95 pour les cellules CD8 SEP vs. Ctrl * $p < 0.05$ (étoile bleu).

Pour les comparaisons entre les populations au sein des mêmes donneurs si les différences sont significatives:

Comparaison CD4 vs. CD4CD8 ou CD8: des étoiles vertes indiquées au dessus des colonnes CD4CD8 ou CD8

CD4CD8 vs. CD8: des étoiles rouges indiquées au dessus des colonnes CD8

4.3 Expression *ex-vivo* de PD1 et de ses ligands par les lymphocytes T.

Notre intérêt pour l'évaluation de l'expression de PD-1 (protéine de la mort cellulaire programmée) provient des travaux antérieurs de notre laboratoire (Pittet et al. 2011). En effet, PD-1 pourrait être impliqué dans l'évolution du modèle de l'EAE ainsi que de la SEP. À ceci, nous avons ajouté les marqueurs pour CD45RA et pour CD45RO pour différencier les lymphocytes naïfs et mémoires. Les PBMCs *ex-vivo* de 8 donneurs sains (figure 20) ont été testées. Un exemple des données obtenues en cytométrie est illustré (figure 20B). Les résultats démontrent que des plus grandes proportions de lymphocytes T DP exprimaient le PD-1, environ 31%, suivi des lymphocytes T CD8 mémoires à 25% puis, celles des lymphocytes T CD4 mémoires, à 13%. Tel qu'attendu, les lymphocytes T CD4 naïfs et CD8 naïfs n'exprimaient que très peu de PD-1. Il serait pertinent d'évaluer l'expression de PD-1 par les lymphocytes T DP des patients atteints de la SEP, en lien avec les changements observés pour les autres marqueurs testés.

La réponse immunologique des lymphocytes peut être modulée par l'expression des ligands PD-L1 et PD-L2 du PD-1 (Dai et al. 2014). Nous avons voulu déterminer si les lymphocytes T DP pouvaient exprimer l'un ou l'autre de ces ligands; nous avons évalué une telle expression chez deux donneurs sains (figure 23 en annexe). Les résultats obtenus nous indiquent qu'aucune des populations de lymphocytes T observée n'exprimait l'un ou l'autre de ces ligands. Nous n'avons pas poursuivi l'étude de ces ligands.

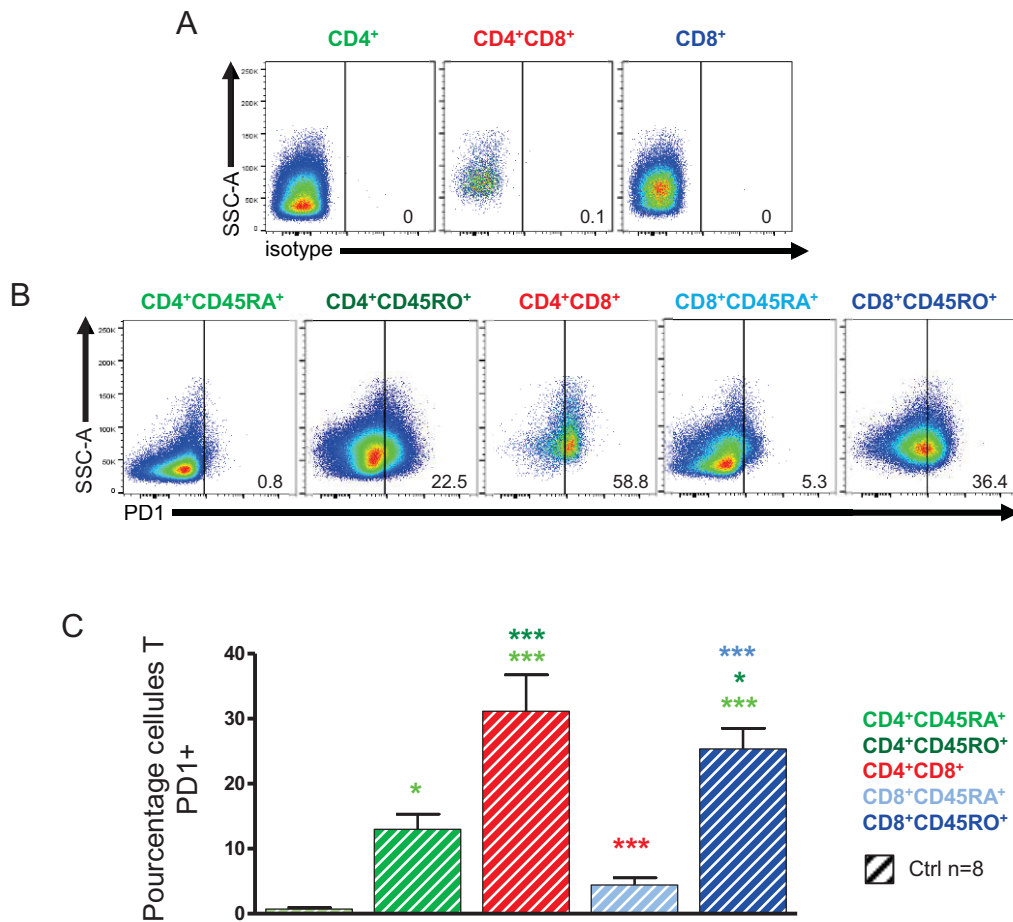


Figure 20: Expression *ex-vivo* de PD1 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains.

Des PBMCs ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO et PD1 puis, analysés par cytométrie. Les proportions de lymphocytes T naïfs et mémoires ainsi que les DP exprimant PD1 ont été déterminées chez 8 donneurs sains. A) Les résultats d'un contrôle isotypique sont illustrés. B) Les résultats obtenus pour un donneur sain sont illustrés. C) Représentation graphique des résultats obtenus à partir des PBMCs de 8 donneurs sains. Les moyennes +/- les SEM sont illustrées. Test d'analyse de variance (ANOVA) CD4CD45RA vs. CD4CD45RO $p < 0.05$ (*), CD8CD45RO $p < 0.001$ (***) et CD4CD8 $p < 0.001$ (***) ; CD4CD45RO vs. CD8CD45RO $p < 0.05$ (*) et DP $p < 0.05$ (***) ; CD4CD8 vs. CD8CD45RA $p < 0.001$ (***) ; CD8CD45RA vs. CD8CD45RO $p < 0.001$ (***) . Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques.

4.4 Expression *ex-vivo* des récepteurs NKG2D, CCR6 et CD161 par les lymphocytes T

Notre laboratoire a précédemment démontré le rôle du NKG2D dans la lyse des oligodendrocytes par des cellules immunes dans le contexte de la SEP par le déclenchement d'activités cytotoxiques lors de la liaison de NKG2D et de ses ligands (Saikali et al. 2007). Nous avons évalué l'expression du NKG2D par des PBMCs *ex-vivo* de quatre donneurs sains (Figure 21). Un exemple des données obtenues en cytométrie est illustré à la figure 21A. Nous avons observé que près de 88% des lymphocytes T CD8 exprimaient ce récepteur. Environ 43% des lymphocytes T DP et une très faible proportion des lymphocytes T CD4 exprimaient aussi ce récepteur. Malgré le petit nombre de nos donneurs, les différences d'expression étaient significativement différentes pour toutes les sous-populations.

Il a récemment été publié que les lymphocytes T CD8 qui expriment à la fois CD161 et CCR6 ont des caractéristiques requises pour être une population potentiellement pathogénique dans le contexte de la SEP par leurs capacités migratoires et d'activités cytotoxiques (Annibali et al. 2011). Nous avons déterminé si les lymphocytes T DP présentaient une population importante de cellules CD161CCR6 double positives. La spécificité du marquage ainsi que des compensations utilisées a été démontrée à l'aide d'un contrôle FMO (figure 22A). La présence d'une population de lymphocytes T CD8 CCR6^{haute}CD161^{haute} a pu être observée, mais dans une moindre proportion chez les patients atteints de la SEP que chez les donneurs sains. Une population de lymphocytes T DP CCR6^{haute}CD161^{haute} a aussi pu être observée et était moins importante chez les patients atteints de la SEP que chez les donneurs sains. De plus, nous avons détecté une grande variation inter-donneurs; le pourcentage des lymphocytes T DP ou CD8 qui exprimaient des niveaux élevés des CCR6 et CD161 étaient variables d'un donneur à l'autre (voir barre d'erreur plus grande que pour les autres marqueurs). Aucune différence significative n'a été observée entre les patients atteints de la SEP et les donneurs sains (figure 22B); l'unique différence a été observée entre les lymphocytes T CD4 et DP des donneurs sains (figure 22B).

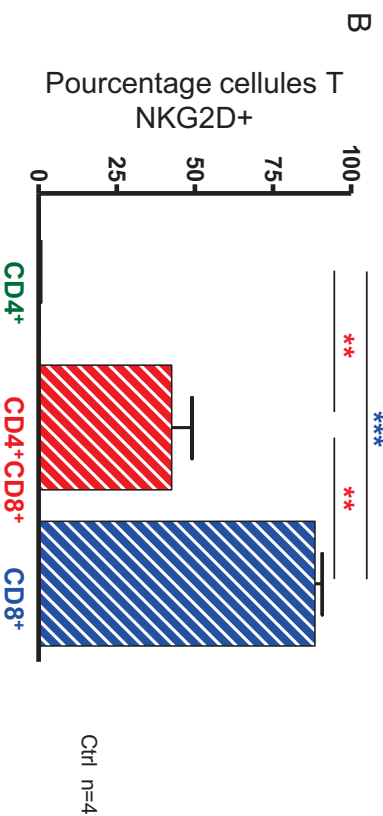
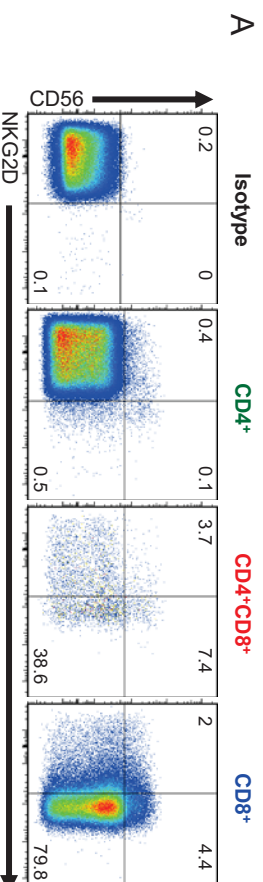


Figure 21: Expression *ex-vivo* du récepteur NKG2D par différentes sous-populations de lymphocytes T humains. Des PBMCs ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD56, et NKG2D puis, analysés par cytométrie. Les proportions de lymphocytes T CD4, CD4CD8 et CD8 exprimant le NKG2D ont été déterminées. A) Les résultats obtenus pour un donneur sain sont illustrés. B) Les moyennes des pourcentages des cellules exprimant les molécules d'intérêt +/- les SEM sont illustrées pour quatre donneurs sains. Test d'analyse de variance (ANOVA): CD4 vs. CD4CD8 ou CD8 $p < 0.01$; CD4CD8 vs. CD8 $p < 0.01$. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques à partir des cellules CD3 positives.

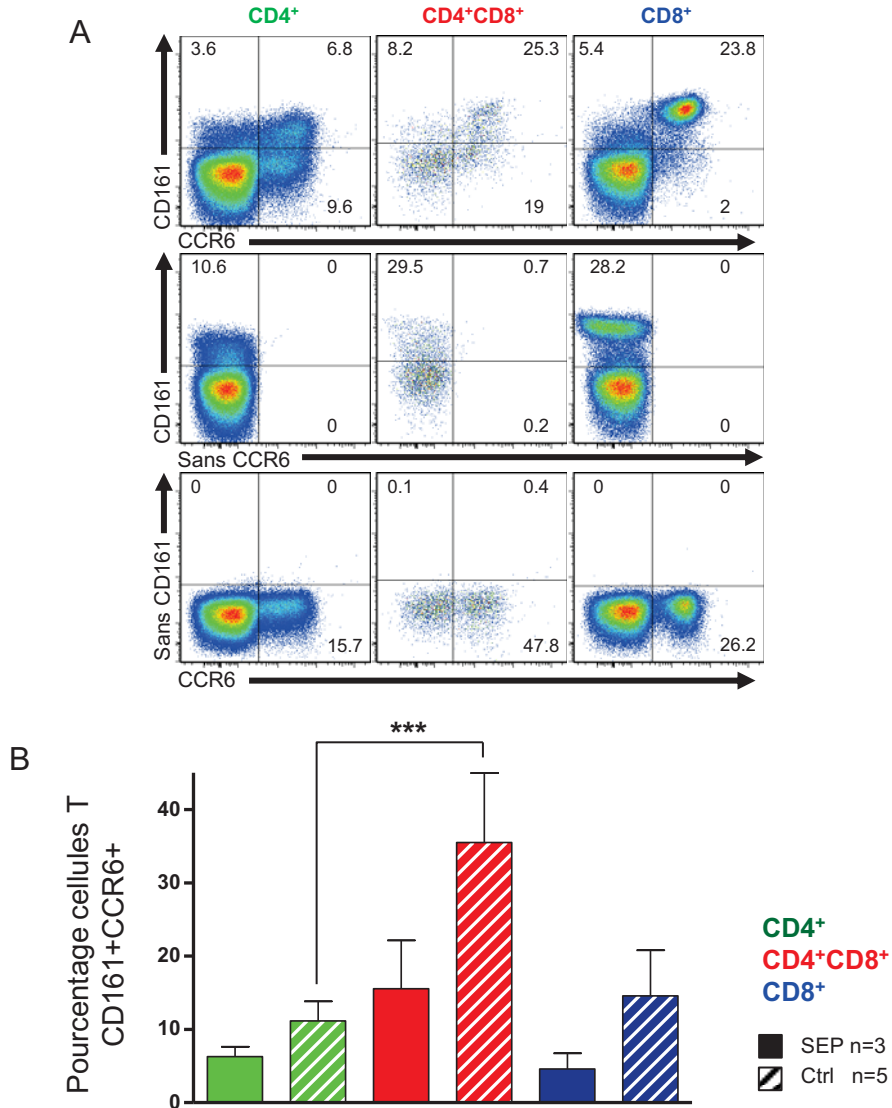


Figure 22: Expression *ex-vivo* de CD161 et de CCR6 par les différentes sous-populations de lymphocytes T humains.

Des PBMCs ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, CD56, CD161 et CCR6 puis, analysés par cytométrie. Les proportions de lymphocytes T CD4, DP et CD8 exprimant CD161 et CCR6 ont été déterminées chez des donneurs sains et des patients non traités atteints de la SEP. A) Les résultats d'un contrôle FMO sont illustrés. B) Les pourcentages de cellules exprimant CD161 et CCR6 de 5 donneurs sains et de 3 patients SEP non traités. Les moyennes +/- les SEM sont illustrées. Test d'analyse de variance (ANOVA), *** $p < 0.001$. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques.

Discussion

Fréquence des lymphocytes T DP

Nous avons observé une fréquence similaire des lymphocytes T DP parmi les PBMCs des donneurs sains et des patients atteints de la SEP (figure 6H). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par d'autres (Waschbisch et al. 2014), qui ont aussi observé une fréquence similaire entre ces deux groupes de donneurs. De plus, ce groupe a aussi noté une fréquence équivalente chez les patients atteints de la SEP et traités au Natalizumab. Tout comme le groupe de Waschbisch et collègues, nous avons utilisé des échantillons provenant de patients atteints de la forme cyclique de la SEP. Toutefois, une autre équipe (Munschauer et al. 1993) a rapporté une augmentation de la fréquence de ces lymphocytes T DP chez les patients atteints de la SEP, mais parmi leur cohorte de patients, 45% de ceux-ci présentaient une forme secondaire progressive pouvant refléter une pathologie plus avancée, tel que discuté par Waschbisch et collègues (Waschbisch et al. 2014). Finalement, même si la fréquence des lymphocytes T DP dans le LCR des patients atteints de différentes pathologies neurologiques semble supérieure à celle du sang périphérique, ces cellules n'ont pu être détectées dans les lésions du SNC des patients de la SEP (Waschbisch et al. 2014).

À l'inverse, plusieurs études ont plutôt rapporté une augmentation de la fréquence des lymphocytes T DP chez des patients atteints de conditions pathologiques diverses. L'équipe de Nascimbeni a observé chez des patients atteints de l'hépatite B et C une augmentation de la fréquence des lymphocytes T DP dans le sang périphérique et dans le foie, où une activité antivirale leur a été attribuée (Nascimbeni et al. 2011). Certains travaux suggèrent que ces cellules possèdent aussi une activité cytotoxique alors qu'une infiltration importante de lymphocytes T DP a été rapportée dans les mélanomes et certains tissus cancéreux dont le cancer du sein (Desfrancois et al. 2009, Desfrancois et al. 2010). Une augmentation des lymphocytes T DP ayant des caractéristiques de type Th2 a aussi été rapportée dans le liquide synovial de patients atteints de la PR (Quandt et al. 2014). Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, une augmentation de la fréquence des lymphocytes T DP périphérique a été observée dans les stades précoces, mais pas tardifs de la maladie (Hisanaga et al. 2001). La maladie cœliaque est l'une des rares pathologies où une diminution des lymphocytes T DP a été plutôt observée dans le sang et ce, autant chez les patients non traités que les patients

traités (Carton et al. 2004) et aussi aux sites d'inflammation dans la lamina propria des colites ulcéreuses de ces patients (Senju et al. 1991).

Plusieurs travaux ont démontré l'absence de lymphocytes T $\gamma\delta$ ainsi que des iNKT parmi les lymphocytes T DP lors de leur sélection (Quandt et al. 2014) et revue par (Parel and Chizzolini 2004). Seul le groupe de Zloza suggère qu'il y a une contamination possible des lymphocytes T DP par des NK et des iNKT (Zloza and Al-Harhi 2006). Cette contamination n'a pas été observée dans nos résultats et peut facilement être évitée par l'inclusion d'un marquage du TCR $\alpha\beta$. Bien que notre méthodologie soit différente de celle de Waschbisch et collègues par l'inclusion de marqueurs supplémentaires, d'une sélection plus stricte (élimination des doublets) ainsi qu'un marquage effectué sur des PBMCs contrairement à du sang complet, nos résultats concordent pour la fréquence des lymphocytes T périphériques avec ceux de cette équipe.

Signature des cytokines et enzymes lytiques produites par les cellules T DP

Plusieurs groupes ont caractérisé les lymphocytes T DP suite à leur isolement à partir de tissus, de cultures cellulaires, de manipulation menant à l'obtention de lignées cellulaires ou d'activation in vitro (Prince et al. 1994, Weiss et al. 1998, Hisanaga et al. 2001, Sullivan et al. 2001, Suni et al. 2001, Zloza et al. 2003, Parel and Chizzolini 2004, Parel et al. 2007, Desfrancois et al. 2009, Xie et al. 2009, Desfrancois et al. 2010, Nascimbeni et al. 2011, Frahm et al. 2012, Eljaafari et al. 2013, Quandt et al. 2014, Sarrabayrouse et al. 2014). Nous avons plutôt choisi d'analyser les propriétés des cellules T DP *ex-vivo* ou après une très courte stimulation in vitro; aucun des travaux publiés ne présente une telle caractérisation. Nous avons évalué si les cellules T DP obtenues de patients atteints de la SEP possèdent des propriétés altérées en comparaison avec celles de donneurs sains. Étant donné le rôle attribué à certaines sous-populations lymphocytaires inflammatoires dans la patho-biologie cette maladie, nous avons évalué la production de cytokines dites signatures des Th1/Th2/Th17 (Hedegaard et al. 2008, Burman et al. 2014). Nous avons aussi évalué la production d'enzymes associées à une activité cytotoxique étant donné qu'une augmentation de leur

production a été notée dans diverses pathologies (Weiss et al. 1998, Suni et al. 2001, Kitchen et al. 2004, Nascimbeni et al. 2004, Frahm et al. 2012).

Nous avons observé chez les donneurs sains une plus grande proportion de lymphocytes T DP produisant l'IFN- γ , l'IL-4, la perforine ou le granzyme B comparativement aux lymphocytes T CD4 et CD8 (figure 14). Par contre, chez les patients atteints de la SEP, les pourcentages de cellules DP produisant l'IFN- γ , la perforine ou le granzyme B étaient diminués sans que les fréquences de cellules produisant l'IL-4 ou l'IL-17a n'aient été modifiées. Les lymphocytes T DP possèdent donc un profil d'expression qui les différencie des lymphocytes T CD4 et CD8 autant chez les donneurs sains que chez les patients atteints de la SEP. De plus, la diversité des cytokines produites par les cellules T DP suite à une courte stimulation au PMA+ionomycine suggère que ces cellules ne représentent pas une population homogène.

En effet, la caractérisation des lymphocytes T DP, dans le contexte du syndrome du côlon irritable, centrée sur les CD4CD8 $\alpha\alpha$, démontre que ceux-ci produisent du TNF, et de l'IFN- γ (50% d'entre eux-ci) mais pas d'IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 ou IL-22. Une production d'IL-10 en l'absence de l'expression de Foxp3 a aussi été décrite (Sarrabayrouse et al. 2014) pour cette sous-population. Dans le contexte de la PR, Quandt et collègues ont observé une très faible expression d'IL-4 qui était toutefois légèrement plus élevée chez les patients (2% vs. 1%) pour les lymphocytes T DP synoviaux; la production d'IFN- γ était similaire entre les patients et les donneurs sains. Cette production d'IFN- γ a aussi été évaluée à partir de PBMCs, mais à l'aide d'une stimulation différente de la nôtre; cette équipe n'a pas rapporté la production d'IL-17 (Quandt et al. 2014). La caractérisation des lymphocytes T DP isolés des lymphocytes associés aux tumeurs (TAL) a démontré que ces cellules peuvent produire non seulement de l'IFN- γ et du TNF, mais aussi de l'IL-4, IL-2, IL-5, IL-13, et GM-CSF; ces cellules ont un potentiel lytique de par leur forte production de perforine, granzyme et activité de dégranulation (CD107a). Bien que les niveaux de TNF, d'IFN- γ et GM-CSF étaient similaires entre les lymphocytes T DP, les CD4 et les CD8, le pourcentage de lymphocytes T DP produisant de l'IL-2, IL-4, IL-5 et l'IL-13 étaient statistiquement plus élevé que celui des autres populations lymphocytaires (Desfrancois et al. 2009). La caractérisation des lymphocytes T DP CD4^{haut}CD8^{haut} obtenus d'échantillon de peau de donneurs sains ainsi que

de patients atteints de sclérodémie a démontré une production d'IFN- γ et d'IL-4 par ces cellules, mais la production d'IL-4 était considérablement augmentée chez les patients comparativement aux donneurs sains (Parel et al. 2007). Ces travaux suggèrent que le profil des cytokines produites par les lymphocytes T DP est différent au sein des sous-populations CD4CD8 $\alpha\beta$ ou CD4CD8 $\alpha\alpha$.

N'ayant pas tenu compte de ces différentes sous-populations, car nous avons regroupé tous les lymphocytes T DP en un seul ensemble lors de nos analyses, nous ne pouvons pas déterminer si les changements que nous avons observés affectent spécifiquement l'une ou l'autre de ces sous-populations. Toutefois, il est possible de sélectionner préférentiellement soit les lymphocytes T DP CD4CD8 $\alpha\beta$ ou les lymphocytes T DP CD4CD8 $\alpha\alpha$ selon une comparaison du marquage de CD4 et de CD8. En effet, les lymphocytes T CD4CD8 $\alpha\beta$ ont une plus faible intensité du CD4 et une plus grande intensité du CD8 alors que les lymphocytes T CD4CD8 $\alpha\alpha$ ont une intensité plus forte du CD4 et plus faible du CD8. Cette observation peut être confirmée par le marquage spécifique de la forme hétéro dimérique du CD8 $\alpha\beta$ que nous avons testé de façon exploratoire et tel que rapporté par d'autres (Waschbisch et al. 2014). Par contre, il est important de spécifier que nous sommes malheureusement limités par le nombre d'évènements acquis lors de l'expérimentation; ceci rend la sous division des sous-populations des lymphocytes T DP dans la présente analyse difficile étant donné le faible nombre de lymphocytes T DP dans chaque sous-population.

Nos travaux ont démontré que la fréquence des cellules T DP est similaire chez les patients atteints de la SEP et chez les donneurs sains, mais que la fréquence de ces cellules qui produisent de l'IFN- γ , de la perforine et du granzyme B est diminuée chez les patients. Il serait intéressant d'investiguer la présence et les propriétés de ces cellules dans le LCR, le liquide biologique de l'organe ciblé par cette maladie. Des études portant sur les caractéristiques des lymphocytes T CD4 et CD8 de patients atteints de la SEP ont utilisé des stimulations à l'aide de peptides et protéines spécifiques du SNC; ces travaux ont démontré une plus grande activation et production de cytokines pro-inflammatoires chez les patients SEP que les donneurs sains (Segal 2014). Il serait judicieux d'étendre ces évaluations aux lymphocytes T DP puisque ceux-ci, bien qu'absents du SNC, sont présents dans le LCR et réagissent fortement aux peptides viraux (Waschbisch et al. 2014).

Propriétés des cellules T CD4 et CD8 du sang de patients atteints de la SEP

Nous avons pu comparer les résultats de nos analyses sur les lymphocytes T CD4 et CD8 avec ceux rapportés dans la littérature scientifique. Plusieurs groupes ont démontré une augmentation de la fréquence de cellules T CD4 qui peuvent produire de l'IL-17a chez les patients atteints de la SEP comparativement aux donneurs sains (Waisman et al. 2015). Nous avons vu une légère hausse dans notre cohorte de patients par rapport aux donneurs sains sans que cette différence atteigne des niveaux statistiquement significatifs (figure 14); il faudrait sans doute augmenter le nombre de donneurs. Une variation de l'IL-17 a aussi été observée entre les patients en rémission et en poussée (Kebir et al. 2009), mais nous n'avons pas pu tenir compte de cette différence dans notre analyse, car peu de patients étaient en poussée au moment du don de sang. Nous n'avons pas observé de diminution de l'IFN γ entre les patients et les donneurs sains contrairement aux deux groupes précédents (Becher et al. 1999, Franciotta et al. 2000). Le nombre limité de patients étudiés pourrait être en cause dans cette différence. Nous n'avons pas observé de variation de l'IL-4 entre les patients et les donneurs sains (figure 14), observation préalablement rapportée (Franciotta et al. 2000). L'évaluation de la perforine et de granzyme B au niveau de l'ARNm des lymphocytes T CD8 périphériques rapporte une diminution de ceux-ci chez les patients comparativement aux donneurs sains (Malmestrom et al. 2008). Il s'agit d'une observation qui s'accorde avec nos résultats où nous notons une diminution dans le pourcentage de lymphocytes T CD4 et CD8 pour ces deux enzymes entre les patients et les donneurs sains. De plus, la plus grande proportion de lymphocytes T CD8 qui produisent ces deux enzymes par rapport aux cellules T CD4 a aussi été observée par d'autres chez les donneurs sains (Lin et al. 2014). Plus récemment, il a été avancé que la perte d'enzymes lytiques des lymphocytes T CD8 (perforine et granzyme B) pourrait être reliée à la perte de fonctionnalité des lymphocytes CD8 Treg chez les patients atteints de la SEP (Cunnusamy et al. 2014).

Activité régulatrice des lymphocytes T DP

Pour ce qui est d'un rôle possible d'immunorégulateur des lymphocytes T DP, il existe quelques exemples où ceux-ci semblent moduler la réponse immunitaire. Dans le modèle de l'EAE, le transfert adoptif de cette population a mené à une certaine protection lors de l'induction de la pathologie (Tutaj and Szczepanik 2007). Dans la maladie du lupus érythémateux disséminé, les lymphocytes T DP pourraient avoir un rôle dans la suppression d'auto anticorps (Wu et al. 2014). Une activité régulatrice de protection leur est attribuée dans la maladie du greffon contre l'hôte où ceux-ci, isolés de biopsies produisent de haut niveau d'IL-10, mais de bas niveau d'IL-2 et d'IFN- γ (Eljaafari et al. 2013). Rappelons aussi que leur absence ou leur forte diminution semblent aussi être reliées à l'évolution de la maladie cœliaque (Carton et al. 2004), tout comme leur diminution aux sites d'inflammation des colites ulcéreuses (Senju et al. 1991). Les lymphocytes T DP ralentissent aussi la progression du *mycose fongique*, qui est caractérisée par une multiplication de lymphocytes au niveau cutané (De Marchi et al. 2014). Les lymphocytes T DP, même en très faible nombre, ont aussi été rapportés pour consommer excessivement rapidement l'IL-2 et donc par compétition, moduler la régulation de la réponse immunitaire dépendante de l'IL-2 (Eljaafari et al. 2013). Il est donc fortement possible qu'une activité de régulation soit attribuée à une petite population de lymphocytes T DP et que celle-ci soit affectée dans la SEP. Dans les modèles animaux, l'expression de FOXP3 a été rapportée parmi les DP des cochons (Kaser et al. 2008) et des chiens (Pinheiro et al. 2011). Malheureusement, il n'existe aucune évaluation directe des marqueurs d'expression classiquement associée aux Treg chez l'être humain et l'attribution d'un rôle régulateur est plutôt la conséquence d'observations phénotypiques.

Caractérisation du phénotype de surface

Contrairement à la caractérisation des cytokines et enzymes produites par les lymphocytes T DP, la caractérisation des marqueurs de surface partage beaucoup plus de similitude entre les études et diffère seulement sur la base de la localisation des lymphocytes T DP évalués dont quelques exemples seront élaborés ultérieurement. La détermination de l'état général d'activation des lymphocytes T DP étant un thème récurrent dans leur caractérisation, de nombreuses études ont été résumées par Overgaard (Overgaard et al. 2015). Pour les sous-

populations des lymphocytes T DP, Nascimbeni et collègues ont observé que les lymphocytes T DP $CD4^{bas}CD8^{haut}$ sont généralement des cellules effectrices mémoires (CCR7) et que les lymphocytes T DP $CD4^{haut}CD8^{bas}$ sont principalement des cellules centrales mémoires (Nascimbeni et al. 2004); ces observations ont aussi été publiées par d'autres (Frahm et al. 2012, Quandt et al. 2014). Plusieurs n'ayant pas fait de distinction entre les sous-populations de lymphocytes T DP, rapportent aussi la forte tendance de ceux-ci à arborer des caractéristiques mémoires (Desfrancois et al. 2009, Waschbisch et al. 2014). Nous avons observé une tendance similaire dans la comparaison des marquages de $CD45RO^{+}CCR7^{+}$ entre les lymphocytes T (CD4, CD8 et DP) (figure 17) où l'expression de CCR7 est supérieure sur les lymphocytes T $CD4^{+}CD45RO^{+}$ et DP comparativement aux lymphocytes T $CD8^{+}CD45RO^{+}$. Nous avons obtenu toutefois des pourcentages plus élevés pour tous nos résultats, dans l'évaluation de l'expression de CCR7, une différence qui pourrait être due à notre méthode d'analyse. Cette hypothèse est aussi renforcée par le fait que nous observons aussi une expression supérieure du CCR7 par rapport à ce que d'autres ont aussi rapporté sur les lymphocytes T (Nascimbeni et al. 2004, Quandt et al. 2014, Waschbisch et al. 2014).

L'expression du CD57 est associée à la sénescence et à la forte activation des lymphocytes T (Focosi et al. 2010). Une expression plus élevée par une sous population lymphocytaire pourrait suggérer un état général d'activation plus important. Le groupe de Nascimbeni a observé que la fréquence de cellules T DP qui expriment CD57 était significativement plus élevée que celle des lymphocytes T CD4, mais cette différence n'était pas significative par rapport aux cellules T CD8 (Nascimbeni et al. 2004). Il est aussi possible d'observer, dans la présentation de leurs résultats, une grande variation inter-donneur pour l'expression de CD57 parmi les lymphocytes T CD8 et DP. Notre propre évaluation du CD57 (figure 19B) montre aussi une grande variation inter-donneur pour les lymphocytes T DP, mais seulement pour les lymphocytes T CD8 lorsque CD57 a été évalué chez les patients atteints de la SEP. Cette expression plus stable nous a permis d'observer une différence significative entre les lymphocytes T CD8 et DP que le groupe de Nascimbeni n'a pas observée. Toutefois, l'expression du CD57 était similaire entre les deux groupes de donneurs.

L'expression de CXCR3 ayant été liée à l'accumulation de lymphocytes T dans le LCR indépendamment de l'inflammation du SNC par Sorensen et collègues (Sorensen et al. 2002),

nous voulions déterminer son expression par les lymphocytes T DP. Ceci nous a permis de constater que le CXCR3 est fortement exprimé par les lymphocytes T DP et CD8 naïfs et mémoires et à des niveaux statistiquement supérieurs aux lymphocytes CD4 naïfs et mémoires, mais sans modification entre les patients atteints de la SEP et les donneurs sains (figure 18). L'expression plus élevée du CXCR3 par les lymphocytes T DP pourrait en partie expliquer pourquoi leur fréquence est augmentée dans le LCR chez les patients atteints de la SEP (Waschbisch et al. 2014) puisque l'expression de CXCR3 est associée au trafic cellulaire (Groom and Luster 2011). Bien que Nascimbeni et collègues ont déjà publié leurs résultats sur l'expression du CXCR3 par les lymphocytes T de donneurs sains, notre inclusion des marqueurs de CD45RA et CD45RO nous permet de différencier les lymphocytes T naïfs et mémoires ainsi que d'y observer des différences qu'ils n'ont pas pu rapporter (Nascimbeni et al. 2004).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le maintien homéostatique du système immunitaire évitant ainsi le développement de maladie auto-immune. L'activation de la mort cellulaire programmée est l'un de ceux-ci; une dérégulation de celle-ci a été rapportée dans la SEP en lien avec le fonctionnement de CD95 (Moreno et al. 2014). Malgré une expression plus élevée du CD95 par les lymphocytes T DP, nous avons seulement observé une augmentation d'expression de CD95 chez les lymphocytes T CD8 des patients atteints de la SEP en comparaison aux cellules de donneurs sains (figure 19C), tel que préalablement rapporté (Petelin et al. 2004). Toutefois, il y a moins de variation inter-donneurs dans le marquage du CD95 parmi les patients atteints de la SEP comparativement aux donneurs sains et cette expression semble légèrement plus élevée chez les patients. Plusieurs thérapies dont les corticostéroïdes peuvent modifier l'expression du CD95 qui est plus élevée au moment d'une poussée (Petelin et al. 2004). Ainsi, l'évaluation de son expression par les lymphocytes T DP en relation à ces changements pourrait nous donner de meilleures indications sur son lien possible avec l'apoptose dans la SEP.

L'expression de PD1 ainsi que de ses ligands ont déjà été impliquées dans la SEP (Kroner et al. 2005, Trabattoni et al. 2009, Dai et al. 2014), leurs expressions et leurs fonctions étant reliées au maintien homéostatique du système immunitaire. L'expression plus élevée du PD1 par les lymphocytes T DP que par les cellules T CD4 ou CD8, suggère que ces cellules

ont été activées (figure 20C). De plus, l'expression de PD-1 est aussi utilisée dans l'évaluation de l'exhaustion cellulaire ce qui ferait des DP une population plus susceptible d'avoir été suractivée. Nous n'avons malheureusement pas évalué l'expression de PD1 parmi les patients atteints de la SEP. Le PD1 possède deux ligands ayant des fonctions dans la régulation immunitaire revue par (Keir et al. 2008); nous avons évalué si les lymphocytes T DP pouvaient les exprimer. Nous n'avons pas détecté l'expression des PD-L1 et PD-L2 par les lymphocytes T DP parmi les donneurs sains (figure 23 en annexe). Nos résultats suggèrent que les lymphocytes T DP n'ont pas de fonction régulatrice dépendante de l'expression du PD-L1 ou PD-L2; toutefois, l'expression du PD1 par une forte proportion de ceux-ci les rend potentiellement sensibles à l'action de ses ligands.

Annibali et collègues ont associé la double expression du CD161 et du CCR6 par les lymphocytes T CD8 à un rôle potentiellement pathologique dans la SEP (Annibali et al. 2011). De plus, le CD161 (récepteur lectine de type C) a été lié à un risque génétique dans la SEP (International Multiple Sclerosis Genetics et al. 2007) et ce, même si la fonction exacte du CD161 est toujours discutée sans être exclusivement attachée à une action pathologique (Fergusson et al. 2011). Quand au CCR6, celui-ci serait impliqué dans la migration des cellules T vers des organes (Yamazaki et al. 2008). Nous avons donc déterminé quel pourcentage des lymphocytes T DP co-expriment ces deux récepteurs. Bien qu'une plus haute expression de ces molécules soit retrouvée chez les lymphocytes T DP, cette expression semble partager les caractéristiques retrouvées chez les lymphocytes T CD4 et CD8. En effet, les lymphocytes T DP semblent posséder une population de $CD161^{\text{haut}}CCR6^{\text{haut}}$ tel que les lymphocytes T CD8 en plus d'une population dont l'expression de $CD161^+CCR6^+$ semble similaire aux lymphocytes T CD4 (figure 22C). Nous n'avons pas observé de différences entre les patients atteints de la SEP et les donneurs sains, seulement entre les lymphocytes T CD4 et DP des donneurs sains où la co-expression de $CD161^+CCR6^+$ est supérieure chez les lymphocytes T DP.

Notre laboratoire a un intérêt pour le récepteur NKG2D qui est exprimé par plusieurs populations lymphocytaires effectrices (Saikali et al. 2007). Lorsque ce récepteur se lie à un de ses nombreux ligands, ceci déclenche une réponse cytotoxique (Taylor and Gribben 2015). Nous avons déterminé que le NKG2D est détecté sur près de la moitié des lymphocytes T DP

comparativement à ce qui est bien établi dans la littérature pour les autres populations lymphocytaires (Spear et al. 2013): le NKG2D est rarement présent sur les lymphocytes T CD4, mais est détectable chez presque la totalité des lymphocytes T CD8 (figure 21B). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par d'autres équipes (Desfrancois et al. 2009, Spear et al. 2013). Lorsque nous prenons en considération les sous-populations multiples des lymphocytes T DP, il est étonnant de constater que seule la moitié de ceux-ci expriment NKG2D. Jusqu'à présent, seul l'expression de CD8 sous la forme $\alpha\alpha$ ou $\alpha\beta$ a été avancée pour différencier les sous-populations de lymphocytes T DP (Al-Harhi 2012). Puisqu'il nous a été possible d'observer que seule la population de lymphocytes T DP ayant un CD8 $\alpha\beta$ exprimait NKG2D lorsqu'évalué *ex-vivo*, l'évaluation de cette expression pourrait servir à différencier ces deux sous-populations de lymphocytes T DP lorsque le marquage spécifique de CD8 $\alpha\alpha$ et CD8 $\alpha\beta$ est impossible.

Réponses à l'IL-15

Une expression augmentée de l'IL-15 a été liée à l'amplification des propriétés pathogéniques de plusieurs types cellulaires dans la SEP (Saikali et al. 2010, Broux et al. 2015). Cette cytokine provient de sources variées tels que les macrophages, les astrocytes et les lymphocytes B (Schneider et al. 2011, Broux et al. 2015). Le récepteur de l'IL-15 est davantage exprimé par les lymphocytes T DP que les lymphocytes T CD4 ou CD8, mais de façon similaire chez les patients atteints de la SEP et les donneurs sains. Davantage de lymphocytes T CD8 des donneurs sains et des patients expriment le récepteur de l'IL-15 par rapport aux cellules T CD4, tel que notre groupe a déjà rapporté (Schneider et al. 2011). Les sous-unités du récepteur de l'IL-15 étant aussi partagées avec le récepteur de l'IL-2, nous avons stimulé les PBMCs des donneurs sains afin de déterminer la réponse des lymphocytes T face à une stimulation par ces deux cytokines. Puisque l'IL-15 a été rapporté pour stimuler davantage les lymphocytes T mémoires, tel les CD8 T mémoires (Schneider et al. 2011), nous avons aussi inclus les marquages de CD45RA et de CD45RO. Malheureusement, le faible nombre de lymphocytes T DP n'a pas permis de subdiviser ceux-ci entre les lymphocytes T DP CD45RA et CD45RO.

L'évaluation de la phosphorylation de STAT5, incluant dans les voies de signalisation de l'IL-2 et de l'IL-15 (Castro et al. 2011), nous a permis de déterminer que les lymphocytes T DP répondent le plus fortement et le plus longtemps à l'IL-15 et l'IL-2 que les autres lymphocytes T CD4 et CD8 (figure 10). Les lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires possèdent des courbes de réponses similaires durant la cinétique pour l'IL-15. Elles sont aussi supérieures aux réponses des lymphocytes T naïfs pour les deux cytokines. Des tendances similaires sont observées lors de l'évaluation des courbes doses-réponses (figure 11). Par contre, les lymphocytes T CD8 naïfs semblent plus sensibles à l'IL-15 que les lymphocytes T CD4 naïfs (figure 11A). La dose-réponse de l'IL-2, nous montre que les lymphocytes T DP et CD4 mémoires possèdent une sensibilité similaire à la cytokine. Un de nos collègues ayant effectué une caractérisation similaire à l'aide de l'IL-27 a déterminé que les courbes de réponses des lymphocytes T DP sont similaires aux lymphocytes T mémoires. Joint à nos résultats, ceci nous permet d'avancer que les lymphocytes T DP possèdent des caractéristiques qui les différencient des autres populations de lymphocytes T. Les différences dans les courbes de réponses entre les lymphocytes T naïfs et mémoires démontrent l'importance d'inclure les marquages de CD45RA et CD45RO dans l'évaluation du récepteur de l'IL-15. Il est aussi possible d'observer une réponse différente entre les cinétiques à l'IL-15 et l'IL-2 où l'IL-15 provoque une phosphorylation de plus courte durée comparativement à l'IL-2 pour les lymphocytes T mémoires (figure 11), constat aussi avancé par Castro et collègues (Castro et al. 2011). Bien que cette évaluation doit être élargie aux patients atteints de la SEP, les lymphocytes T DP semblent pouvoir répondre à des doses plus faibles d'IL-15 et d'IL-2 tel que les lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires. Il s'agit de résultats intrigants compte tenu de l'augmentation de l'IL-15 dans la SEP et du rôle pathologique que celle-ci aurait (Schneider et al. 2011). Il a été rapporté par Eljaafari et collègues que les lymphocytes T DP pouvaient consommer l'IL-2 à une vitesse suffisamment importante pour influencer les réponses immunitaires dépendantes de celle-ci (Eljaafari et al. 2013). La forte réponse que nous observons face à l'IL-2 n'est donc pas surprenante même si notre approche expérimentale ne permet pas d'élaborer sur cette théorie. À notre connaissance, nous sommes les premiers à évaluer la capacité à répondre des lymphocytes T DP à répondre à une stimulation à l'IL-2 et l'IL-15. Les quelques variations observées dans les figures de nos résultats des cinétiques (figure 10 et 11) sont dues aux petits nombres de répétitions. Ceci étant dû à l'optimisation faite

pour inclure un laps de temps plus long étant donné la réponse plus longue des lymphocytes T DP qu'initialement prévu.

Conclusion

Au final, notre caractérisation des lymphocytes T DP chez les donneurs sains concorde généralement avec la littérature disponible à leur sujet dont un survol a été faite par Overgaard et collègues (Overgaard et al. 2015). Nous pouvons toutefois rapporter d'importantes différences entre les lymphocytes T dans la stimulation de ceux-ci à l'aide de cytokines où les lymphocytes T DP possèdent une réponse qui leur sont propre. Nous avons observé que les lymphocytes T DP périphériques perdent une importante capacité liée à leur potentiel cytotoxique/lytique chez les patients atteints de la SEP. Ceci semble mettre fin à notre hypothèse de départ concernant un rôle pathologique de ceux-ci dans cette pathologie en considérant aussi les informations rassemblées et présentées plus haut. Il se pourrait que ces cellules soient plutôt associées à des rôles régulateurs qui pourraient s'apparenter à ceux avancés pour une sous-population de Treg (Viglietta et al. 2004, Waschbisch et al. 2014). De plus, une petite population de lymphocytes T CD8 Treg a aussi été récemment décrite (Sinha et al. 2014); puisque les lymphocytes T DP possèdent des caractéristiques se rapportant aux lymphocytes T CD4 et CD8, celles-ci pourraient avoir des propriétés de cellules régulatrices CD4 ou CD8.

Pour conclure, ce projet visait à contribuer à l'avancement de la caractérisation d'une sous-population de lymphocytes T, de lymphocytes T DP et de déterminer leur implication possible dans le développement de la SEP. Bien que la caractérisation de cette population en relation avec la SEP ne fasse que débiter, l'importance des changements observés pour certaines de leurs caractéristiques semblent indiquer qu'elles soient fortement influencées par divers phénomènes présents dans la pathologie. Par contre, il reste encore à déterminer le type d'implication que les lymphocytes T DP pourraient avoir en lien avec la pathologie. Pour l'heure, l'ensemble des résultats obtenus nous permettent d'avancer qu'il n'y a pas de changement dans la fréquence périphérique des lymphocytes T DP dans la SEP, mais plutôt une perte de fonction de celles-ci, particulièrement dans les fonctions cytolytiques. Bien que les lymphocytes T DP possèdent de nombreux marqueurs d'activations, ceux-ci ne sont pas spécialement plus élevés dans la SEP. Elles possèdent une réponse qui lui est propre face à la stimulation à de nombreuses cytokines telles que l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-27 dont les études chez les patients SEP pourraient nous apprendre davantage. Enfin, les travaux présentés ne sont que le début de la caractérisation des lymphocytes T DP en relation avec la SEP. De nombreux

travaux restent à accomplir afin de mieux approfondir notre compréhension de cette petite population, mais les informations recueillies ici et ailleurs démontrent déjà que nous aurions beaucoup à y gagner.

Parmi ceux-ci, l'interaction entre les lymphocytes T DP et l'IL-10 est fortement à considérer. En effet, le rôle régulateur des DP serait dépendant de l'IL-10 dans un modèle d'inflammation intestinale où une interaction entre la flore bactérienne, le niveau de la cytokine et les lymphocytes T DP a été avancé (Sarrabayrouse et al. 2014). Dans le contexte de la SEP, le rôle immunomodulateur de l'IL-10 semble aussi être bénéfique (Ashtari et al. 2015) et revue par (Kwilasz et al. 2015) ainsi que dans le modèle EAE (Edwards et al. 2015, Liao et al. 2015, Zhang et al. 2015). L'étude de la relation entre l'IL-10 et les lymphocytes T DP dans la SEP est donc une avenue importante à explorer. Par contre, la découverte d'un marqueur spécifique doit aussi être prioritaire puisque jusqu'à présent, seulement une série de marquage permet l'étude des lymphocytes T DP, ce qui alourdit les travaux nécessaires à son étude.

Bibliographie

- Abadie, V. and B. Jabri (2014). "IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology." Immunol Rev **260**(1): 221-234.
- Abbas, A. K., K. M. Murphy and A. Sher (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-793.
- Aittomaki, S. and M. Pesu (2014). "Therapeutic targeting of the Jak/STAT pathway." Basic Clin Pharmacol Toxicol **114**(1): 18-23.
- Al-Harathi, L. (2012). "Comment on "CD4+ CD8+ T cells represent a significant portion of the anti-HIV T cell response to acute HIV infection"." J Immunol **188**(12): 5809; author reply 5809-5810.
- Allegretta, M., J. A. Nicklas, S. Sriram and R. J. Albertini (1990). "T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis." Science **247**(4943): 718-721.
- Alvarez, B., N. Carbo, J. Lopez-Soriano, R. H. Drivdahl, S. Busquets, F. J. Lopez-Soriano, J. M. Argiles and L. S. Quinn (2002). "Effects of interleukin-15 (IL-15) on adipose tissue mass in rodent obesity models: evidence for direct IL-15 action on adipose tissue." Biochim Biophys Acta **1570**(1): 33-37.
- Amsen, D., R. A. Backer and C. Helbig (2013). "Decisions on the road to memory." Adv Exp Med Biol **785**: 107-120.
- Angiolillo, A. L., H. Kanegane, C. Sgadari, G. H. Reaman and G. Tosato (1997). "Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo." Biochem Biophys Res Commun **233**(1): 231-237.
- Annibaldi, V., G. Ristori, D. F. Angelini, B. Serafini, R. Mechelli, S. Cannoni, S. Romano, A. Paolillo, H. Abderrahim, A. Diamantini, G. Borsellino, F. Aloisi, L. Battistini and M. Salvetti (2011). "CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis." Brain **134**(Pt 2): 542-554.
- Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein and H. von Boehmer (2002). "Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen." Nat Immunol **3**(8): 756-763.
- Arbour, N. and A. Prat (2015). Role of CD4 and CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroinflammation: New insights into beneficial and detrimental functions. S. David, Wiley: in press.
- Aringer, M., G. H. Stummvoll, G. Steiner, M. Koller, C. W. Steiner, E. Hofler, H. Hiesberger, J. S. Smolen and W. B. Graninger (2001). "Serum interleukin-15 is elevated in systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) **40**(8): 876-881.

Artyomov, M. N., M. Lis, S. Devadas, M. M. Davis and A. K. Chakraborty (2010). "CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(39): 16916-16921.

Ashtari, F., N. Toghianifar, S. H. Zarkesh-Esfahani and M. Mansourian (2015). "Short-Term Effect of High-Dose Vitamin D on the Level of Interleukin 10 in Patients with Multiple Sclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial." Neuroimmunomodulation **22**(6): 400-404.

Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid and K. Rajewsky (2000). "Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction." J Exp Med **192**(3): 393-404.

Bagot, M., H. Echchakir, F. Mami-Chouaib, M. H. Delfau-Larue, D. Charue, A. Bernheim, S. Chouaib, L. Boumsell and A. Bensussan (1998). "Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4+ and CD4+CD8dim+ T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma." Blood **91**(11): 4331-4341.

Bahri, R., A. Bollinger, T. Bollinger, Z. Orinska and S. Bulfone-Paus (2012). "Ectonucleotidase CD38 demarcates regulatory, memory-like CD8+ T cells with IFN-gamma-mediated suppressor activities." PLoS One **7**(9): e45234.

Balashov, K. E., J. B. Rottman, H. L. Weiner and W. W. Hancock (1999). "CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6873-6878.

Bar-Or, A., L. Fawaz, B. Fan, P. J. Darlington, A. Rieger, C. Ghorayeb, P. A. Calabresi, E. Waubant, S. L. Hauser, J. Zhang and C. H. Smith (2010). "Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?" Ann Neurol **67**(4): 452-461.

Baranda, L., H. de la Fuente, E. Layseca-Espinosa, D. Portales-Perez, P. Nino-Moreno, G. Valencia-Pacheco, C. Abud-Mendoza, J. Alcocer-Varela and R. Gonzalez-Amaro (2005). "IL-15 and IL-15R in leucocytes from patients with systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) **44**(12): 1507-1513.

Baranzini, S. E., C. Elfstrom, S. Y. Chang, C. Butunoi, R. Murray, R. Higuchi and J. R. Oksenberg (2000). "Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression." J Immunol **165**(11): 6576-6582.

Barbi, J., D. Pardoll and F. Pan (2014). "Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment." Immunol Rev **259**(1): 115-139.

Barr, T. A., P. Shen, S. Brown, V. Lampropoulou, T. Roch, S. Lawrie, B. Fan, R. A. O'Connor, S. M. Anderton, A. Bar-Or, S. Fillatreau and D. Gray (2012). "B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells." J Exp Med **209**(5): 1001-1010.

- Becher, B., P. S. Giacomini, D. Pelletier, E. McCrea, A. Prat and J. P. Antel (1999). "Interferon-gamma secretion by peripheral blood T-cell subsets in multiple sclerosis: correlation with disease phase and interferon-beta therapy." Ann Neurol **45**(2): 247-250.
- Berard, M. and D. F. Tough (2002). "Qualitative differences between naive and memory T cells." Immunology **106**(2): 127-138.
- Bergamaschi, C., J. Bear, M. Rosati, R. K. Beach, C. Alicea, R. Sowder, E. Chertova, S. A. Rosenberg, B. K. Felber and G. N. Pavlakis (2012). "Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Ralpha in human and mouse serum." Blood **120**(1): e1-8.
- Bernard, J., C. Harb, E. Mortier, A. Quemener, R. H. Meloen, C. Vermot-Desroches, J. Wijdeness, P. van Dijken, J. Grotzinger, J. W. Sloodstra, A. Plet and Y. Jacques (2004). "Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15." J Biol Chem **279**(23): 24313-24322.
- Bernards, A. (1991). "Predicted tyk2 protein contains two tandem protein kinase domains." Oncogene **6**(7): 1185-1187.
- Berthelot, L., D. A. Laplaud, S. Pettre, C. Ballet, L. Michel, S. Hillion, C. Braudeau, F. Connan, F. Lefrere, S. Wiertlewski, J. G. Guillet, S. Brouard, J. Choppin and J. P. Soulillou (2008). "Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals." Eur J Immunol **38**(7): 1889-1899.
- Bevan, M. J. and A. W. Goldrath (2000). "T-cell memory: You must remember this." Curr Biol **10**(9): R338-340.
- Bielekova, B., B. Goodwin, N. Richert, I. Cortese, T. Kondo, G. Afshar, B. Gran, J. Eaton, J. Antel, J. A. Frank, H. F. McFarland and R. Martin (2000). "Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand." Nat Med **6**(10): 1167-1175.
- Bielekova, B., M. H. Sung, N. Kadom, R. Simon, H. McFarland and R. Martin (2004). "Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis." J Immunol **172**(6): 3893-3904.
- Blanchette, F. and O. Neuhaus (2008). "Glatiramer acetate: evidence for a dual mechanism of action." J Neurol **255 Suppl 1**: 26-36.
- Blanco-Jerez, C., J. F. Plaza, J. Masjuan, L. M. Orensanz and J. C. Alvarez-Cermeno (2002). "Increased levels of IL-15 mRNA in relapsing--remitting multiple sclerosis attacks." J Neuroimmunol **128**(1-2): 90-94.
- Bobbala, D., X. L. Chen, C. Leblanc, M. Mayhue, J. Stankova, T. Tanaka, Y. G. Chen, S. Ilangumaran and S. Ramanathan (2012). "Interleukin-15 plays an essential role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in the NOD mouse." Diabetologia **55**(11): 3010-3020.

- Booss, J., M. M. Esiri, W. W. Tourtellotte and D. Y. Mason (1983). "Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis." J Neurol Sci **62**(1-3): 219-232.
- Boster, A., D. P. Ankeny and M. K. Racke (2010). "The potential role of B cell-targeted therapies in multiple sclerosis." Drugs **70**(18): 2343-2356.
- Boyer, O., D. Saadoun, J. Abriol, M. Dodille, J. C. Piette, P. Cacoub and D. Klatzmann (2004). "CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis." Blood **103**(9): 3428-3430.
- Braunstein, J., S. Brutsaert, R. Olson and C. Schindler (2003). "STATs dimerize in the absence of phosphorylation." J Biol Chem **278**(36): 34133-34140.
- Brod, S. A., M. Purvee, D. Benjamin and D. A. Hafler (1990). "Frequency analysis of CD4+CD8+ T cells cloned with IL-4." Cell Immunol **125**(2): 426-436.
- Broux, B., M. R. Mizee, M. Vanheusden, S. van der Pol, J. van Horssen, B. Van Wijmeersch, V. Somers, H. E. de Vries, P. Stinissen and N. Hellings (2015). "IL-15 amplifies the pathogenic properties of CD4+CD28- T cells in multiple sclerosis." J Immunol **194**(5): 2099-2109.
- Brown, B. A., P. P. Kantesaria and L. M. McDevitt (2007). "Fingolimod: a novel immunosuppressant for multiple sclerosis." Ann Pharmacother **41**(10): 1660-1668.
- Browne, P., D. Chandraratna, C. Angood, H. Tremlett, C. Baker, B. V. Taylor and A. J. Thompson (2014). "Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity." Neurology **83**(11): 1022-1024.
- Brugnera, E., A. Bhandoola, R. Cibotti, Q. Yu, T. I. Guinter, Y. Yamashita, S. O. Sharrow and A. Singer (2000). "Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells." Immunity **13**(1): 59-71.
- Brunetti, L., M. L. Wagner, M. Maroney and M. Ryan (2013). "Teriflunomide for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a review of clinical data." Ann Pharmacother **47**(9): 1153-1160.
- Burkett, P. R., R. Koka, M. Chien, S. Chai, D. L. Boone and A. Ma (2004). "Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis." J Exp Med **200**(7): 825-834.
- Burman, J., E. Svensson, M. Fransson, A. S. Loskog, H. Zetterberg, R. Raininko, A. Svenningsson, J. Fagius and S. M. Mangsbo (2014). "The cerebrospinal fluid cytokine signature of multiple sclerosis: a homogenous response that does not conform to the Th1/Th2/Th17 convention." J Neuroimmunol **277**(1-2): 153-159.

Burness, C. B. and E. D. Deeks (2014). "Dimethyl fumarate: a review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis." CNS Drugs **28**(4): 373-387.

Burton, J. D., R. N. Bamford, C. Peters, A. J. Grant, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler and T. A. Waldmann (1994). "A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4935-4939.

Burtrum, D. B., S. Kim, E. C. Dudley, A. C. Hayday and H. T. Petrie (1996). "TCR gene recombination and alpha beta-gamma delta lineage divergence: productive TCR-beta rearrangement is neither exclusive nor preclusive of gamma delta cell development." J Immunol **157**(10): 4293-4296.

Cao, D., R. van Vollenhoven, L. Klareskog, C. Trollmo and V. Malmstrom (2004). "CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease." Arthritis Res Ther **6**(4): R335-346.

Carrieri, P. B., V. Provitiera, T. De Rosa, G. Tartaglia, F. Gorga and O. Perrella (1998). "Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity." Immunopharmacol Immunotoxicol **20**(3): 373-382.

Carson, W. E., J. G. Giri, M. J. Lindemann, M. L. Linett, M. Ahdieh, R. Paxton, D. Anderson, J. Eisenmann, K. Grabstein and M. A. Caligiuri (1994). "Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor." J Exp Med **180**(4): 1395-1403.

Carter, N. J. and G. M. Keating (2010). "Glatiramer acetate: a review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis and in delaying the onset of clinically definite multiple sclerosis." Drugs **70**(12): 1545-1577.

Carton, J., B. Byrne, L. Madrigal-Estebas, D. P. O'Donoghue and C. O'Farrelly (2004). "CD4+CD8+ human small intestinal T cells are decreased in coeliac patients, with CD8 expression downregulated on intra-epithelial T cells in the active disease." Eur J Gastroenterol Hepatol **16**(10): 961-968.

Castro, I., A. Yu, M. J. Dee and T. R. Malek (2011). "The basis of distinctive IL-2- and IL-15-dependent signaling: weak CD122-dependent signaling favors CD8+ T central-memory cell survival but not T effector-memory cell development." J Immunol **187**(10): 5170-5182.

Castro, M., H. M. van Santen, M. Ferez, B. Alarcon, G. Lythe and C. Molina-Paris (2014). "Receptor Pre-Clustering and T cell Responses: Insights into Molecular Mechanisms." Front Immunol **5**: 132.

Ceccarelli, A., R. Bakshi and M. Neema (2012). "MRI in multiple sclerosis: a review of the current literature." Curr Opin Neurol **25**(4): 402-409.

Chen, J., L. Feigenbaum, P. Awasthi, D. O. Butcher, M. R. Anver, Y. G. Golubeva, R. Bamford, X. Zhang, M. B. St Claire, C. J. Thomas, V. Discepolo, B. Jabri and T. A. Waldmann (2013). "Insulin-dependent diabetes induced by pancreatic beta cell expression of IL-15 and IL-15Ralpha." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(33): 13534-13539.

Chen, J., M. Petrus, R. Bamford, J. H. Shih, J. C. Morris, J. E. Janik and T. A. Waldmann (2012). "Increased serum soluble IL-15Ralpha levels in T-cell large granular lymphocyte leukemia." Blood **119**(1): 137-143.

Chen, K. and J. K. Kolls (2013). "T cell-mediated host immune defenses in the lung." Annu Rev Immunol **31**: 605-633.

Chen, Z. and M. S. Freedman (2008). "Correlation of specialized CD16(+) gammadelta T cells with disease course and severity in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **194**(1-2): 147-152.

Chertova, E., C. Bergamaschi, O. Chertov, R. Sowder, J. Bear, J. D. Roser, R. K. Beach, J. D. Lifson, B. K. Felber and G. N. Pavlakis (2013). "Characterization and Favorable in Vivo Properties of Heterodimeric Soluble IL-15.IL-15Ralpha Cytokine Compared to IL-15 Monomer." J Biol Chem **288**(25): 18093-18103.

Chou, Y. K., D. N. Bourdette, H. Offner, R. Whitham, R. Y. Wang, G. A. Hashim and A. A. Vandenberg (1992). "Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **38**(1-2): 105-113.

Chrencik, J. E., A. Patny, I. K. Leung, B. Korniski, T. L. Emmons, T. Hall, R. A. Weinberg, J. A. Gormley, J. M. Williams, J. E. Day, J. L. Hirsch, J. R. Kiefer, J. W. Leone, H. D. Fischer, C. D. Sommers, H. C. Huang, E. J. Jacobsen, R. E. Tenbrink, A. G. Tomasselli and T. E. Benson (2010). "Structural and thermodynamic characterization of the TYK2 and JAK3 kinase domains in complex with CP-690550 and CMP-6." J Mol Biol **400**(3): 413-433.

Clark, D. N., J. L. Markham, C. S. Sloan and B. D. Poole (2013). "Cytokine inhibition as a strategy for treating systemic lupus erythematosus." Clin Immunol **148**(3): 335-343.

Codarri, L., M. Greter and B. Becher (2013). "Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease." Trends Immunol **34**(3): 114-119.

Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter and B. Becher (2011). "RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation." Nat Immunol **12**(6): 560-567.

Cohen, B. A. and P. Rieckmann (2007). "Emerging oral therapies for multiple sclerosis." Int J Clin Pract **61**(11): 1922-1930.

Colombatti, A., R. Doliana, M. Schiappacassi, C. Argentini, E. Tonutti, C. Feruglio and P. Sala (1998). "Age-related persistent clonal expansions of CD28(-) cells: phenotypic and

molecular TCR analysis reveals both CD4(+) and CD4(+)CD8(+) cells with identical CDR3 sequences." Clin Immunol Immunopathol **89**(1): 61-70.

Compston, A. and A. Coles (2008). "Multiple sclerosis." Lancet **372**(9648): 1502-1517.

Correale, J. and A. Villa (2008). "Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **195**(1-2): 121-134.

Crawford, M. P., S. X. Yan, S. B. Ortega, R. S. Mehta, R. E. Hewitt, D. A. Price, P. Stastny, D. C. Douek, R. A. Koup, M. K. Racke and N. J. Karandikar (2004). "High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay." Blood **103**(11): 4222-4231.

Crispin, J. C., A. Martinez and J. Alcocer-Varela (2003). "Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." J Autoimmun **21**(3): 273-276.

Crotty, S. (2011). "Follicular helper CD4 T cells (TFH)." Annu Rev Immunol **29**: 621-663.

Cunnusamy, K., E. J. Baughman, J. Franco, S. B. Ortega, S. Sinha, P. Chaudhary, B. M. Greenberg, E. M. Frohman and N. J. Karandikar (2014). "Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8+ T cells." Clin Immunol **152**(1-2): 115-126.

Dai, S., R. Jia, X. Zhang, Q. Fang and L. Huang (2014). "The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases." Cell Immunol **290**(1): 72-79.

Davis, J. P., G. A. Cain, W. J. Pitts, R. L. Magolda and R. A. Copeland (1996). "The immunosuppressive metabolite of leflunomide is a potent inhibitor of human dihydroorotate dehydrogenase." Biochemistry **35**(4): 1270-1273.

De Jager, P. L., E. Rossin, S. Pyne, P. Tamayo, L. Ottoboni, V. Viglietta, M. Weiner, D. Soler, E. Izmailova, L. Faron-Yowe, C. O'Brien, S. Freeman, S. Granados, A. Parker, R. Roubenoff, J. P. Mesirov, S. J. Khoury, D. A. Hafler and H. L. Weiner (2008). "Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8^{low} cells." Brain **131**(Pt 7): 1701-1711.

de Kleer, I. M., L. R. Wedderburn, L. S. Taams, A. Patel, H. Varsani, M. Klein, W. de Jager, G. Pugayung, F. Giannoni, G. Rijkers, S. Albani, W. Kuis and B. Prakken (2004). "CD4+CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis." J Immunol **172**(10): 6435-6443.

De Marchi, S. U., G. Stinco, E. Errichetti, S. Bonin, N. di Meo and G. Trevisan (2014). "The influence of the coexpression of CD4 and CD8 in cutaneous lesions on prognosis of mycosis fungoides: a preliminary study." J Skin Cancer **2014**: 624143.

De Maria, A., M. Malnati, A. Moretta, D. Pende, C. Bottino, G. Casorati, F. Cottafava, G. Melioli, M. C. Mingari, N. Migone and et al. (1987). "CD3+4-8-WT31-(T cell receptor

gamma+) cells and other unusual phenotypes are frequently detected among spontaneously interleukin 2-responsive T lymphocytes present in the joint fluid in juvenile rheumatoid arthritis. A clonal analysis." Eur J Immunol **17**(12): 1815-1819.

Desfrancois, J., L. Derre, M. Corvaisier, B. Le Mevel, V. Catros, F. Jotereau and N. Gervois (2009). "Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 alphabeta T cells in human breast pleural effusions." Int J Cancer **125**(2): 374-380.

Desfrancois, J., A. Moreau-Aubry, V. Vignard, Y. Godet, A. Khammari, B. Dreno, F. Jotereau and N. Gervois (2010). "Double positive CD4CD8 alphabeta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas." PLoS One **5**(1): e8437.

Devine, L., L. J. Kieffer, V. Aitken and P. B. Kavathas (2000). "Human CD8 beta, but not mouse CD8 beta, can be expressed in the absence of CD8 alpha as a beta beta homodimer." J Immunol **164**(2): 833-838.

Di Sabatino, A., R. Ciccocioppo, F. Cupelli, B. Cinque, D. Millimaggi, M. M. Clarkson, M. Paulli, M. G. Cifone and G. R. Corazza (2006). "Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease." Gut **55**(4): 469-477.

Dubois, S., J. Mariner, T. A. Waldmann and Y. Tagaya (2002). "IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells." Immunity **17**(5): 537-547.

Duddy, M., M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, H. Atkins, H. J. Kim and A. Bar-Or (2007). "Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis." J Immunol **178**(10): 6092-6099.

Edwards, S. C., S. C. Higgins and K. H. Mills (2015). "Respiratory infection with a bacterial pathogen attenuates CNS autoimmunity through IL-10 induction." Brain Behav Immun.

Egerton, M., K. Shortman and R. Scollay (1990). "The kinetics of immature murine thymocyte development in vivo." Int Immunol **2**(6): 501-507.

El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G. X. Zhang, B. N. Dittel and A. Rostami (2011). "The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF." Nat Immunol **12**(6): 568-575.

Elices, M. J., L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler and R. R. Lobb (1990). "VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site." Cell **60**(4): 577-584.

Eljaafari, A., O. Yuruker, C. Ferrand, A. Farre, C. Addey, M. L. Tartelin, X. Thomas, P. Tiberghien, E. Simpson, D. Rigal and D. Scott (2013). "Isolation of human CD4/CD8 double-positive, graft-versus-host disease-protective, minor histocompatibility antigen-specific regulatory T cells and of a novel HLA-DR7-restricted HY-specific CD4 clone." J Immunol **190**(1): 184-194.

- Elong Ngonu, A., S. Pettre, M. Salou, B. Bahbouhi, J. P. Soulillou, S. Brouard and D. A. Laplaud (2012). "Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients." Clin Immunol **144**(2): 117-126.
- Elovaara, I., M. Ukkonen, M. Leppakynnas, T. Lehtimaki, M. Luomala, J. Peltola and P. Dastidar (2000). "Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy." Arch Neurol **57**(4): 546-551.
- Engelborghs, S., M. De Brabander, J. De Cree, R. D'Hooge, H. Geerts, H. Verhaegen and P. P. De Deyn (1999). "Unchanged levels of interleukins, neopterin, interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type." Neurochem Int **34**(6): 523-530.
- Fagerlund, R., K. Melen, L. Kinnunen and I. Julkunen (2002). "Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5." J Biol Chem **277**(33): 30072-30078.
- Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton and C. G. Fathman (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Immunol **156**(1): 5-7.
- Fergusson, J. R., V. M. Fleming and P. Klenerman (2011). "CD161-expressing human T cells." Front Immunol **2**: 36.
- Fillatreau, S., C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray and S. M. Anderton (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." Nat Immunol **3**(10): 944-950.
- Fletcher, J. M., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, N. Tubridy and K. H. Mills (2010). "T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Clin Exp Immunol **162**(1): 1-11.
- Focosi, D., M. Bestagno, O. Burrone and M. Petrini (2010). "CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency." J Leukoc Biol **87**(1): 107-116.
- Frahm, M. A., R. A. Picking, J. D. Kuruc, K. S. McGee, C. L. Gay, J. J. Eron, C. B. Hicks, G. D. Tomaras and G. Ferrari (2012). "CD4+CD8+ T cells represent a significant portion of the anti-HIV T cell response to acute HIV infection." J Immunol **188**(9): 4289-4296.
- Franciotta, D., E. Zardini, R. Bergamaschi, L. Andreoni and V. Cosi (2000). "Interferon-gamma and interleukin-4-producing T cells in peripheral blood of multiple sclerosis patients." Eur Cytokine Netw **11**(4): 677-681.
- Frohman, E. M., M. K. Racke and C. S. Raine (2006). "Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis." N Engl J Med **354**(9): 942-955.

- Furuno, K., T. Yuge, K. Kusuhara, H. Takada, H. Nishio, V. Khajoe, T. Ohno and T. Hara (2004). "CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease." J Pediatr **145**(3): 385-390.
- Gaggero, A., B. Azzarone, C. Andrei, Z. Mishal, R. Meazza, E. Zappia, A. Rubartelli and S. Ferrini (1999). "Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms." Eur J Immunol **29**(4): 1265-1274.
- Gangemi, S., G. Basile, R. A. Merendino, A. Epifanio, G. Di Pasquale, B. Ferlazzo, V. Nicita-Mauro and L. Morgante (2003). "Effect of levodopa on interleukin-15 and RANTES circulating levels in patients affected by Parkinson's disease." Mediators Inflamm **12**(4): 251-253.
- Ghoreschi, K., J. Bruck, C. Kellerer, C. Deng, H. Peng, O. Rothfuss, R. Z. Hussain, A. R. Gocke, A. Respa, I. Glocova, N. Valtcheva, E. Alexander, S. Feil, R. Feil, K. Schulze-Osthoff, R. A. Rupec, A. E. Lovett-Racke, R. Dringen, M. K. Racke and M. Rocken (2011). "Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells." J Exp Med **208**(11): 2291-2303.
- Giri, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman and D. Anderson (1994). "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15." EMBO J **13**(12): 2822-2830.
- Giri, J. G., S. Kumaki, M. Ahdieh, D. J. Friend, A. Loomis, K. Shanebeck, R. DuBose, D. Cosman, L. S. Park and D. M. Anderson (1995). "Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor." EMBO J **14**(15): 3654-3663.
- Gladman, D. D., C. Antoni, P. Mease, D. O. Clegg and P. Nash (2005). "Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome." Ann Rheum Dis **64 Suppl 2**: ii14-17.
- Gold, R. and J. S. Wolinsky (2011). "Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide." Acta Neurol Scand **124**(2): 75-84.
- Goldenberg, M. M. (2012). "Multiple sclerosis review." P T **37**(3): 175-184.
- Gomez-Nicola, D., A. Spagnolo, C. Guaza and M. Nieto-Sampedro (2010). "Aggravated experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-15 knockout mice." Exp Neurol **222**(2): 235-242.
- Gomez-Nicola, D., B. Valle-Argos, M. Suardiaz, J. S. Taylor and M. Nieto-Sampedro (2008). "Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration." J Neurochem **107**(6): 1741-1752.
- Gomez-Tortosa, E., I. Gonzalo, S. Fanjul, M. J. Sainz, S. Cantarero, C. Cemillan, J. G. Yebenes and T. del Ser (2003). "Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease." Arch Neurol **60**(9): 1218-1222.

- Gordon, J. and N. R. Manley (2011). "Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis." Development **138**(18): 3865-3878.
- Gourraud, P. A., H. F. Harbo, S. L. Hauser and S. E. Baranzini (2012). "The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review." Immunol Rev **248**(1): 87-103.
- Goverman, J., A. Perchellet and E. S. Huseby (2005). "The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **4**(2): 239-245.
- Grabstein, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh and et al. (1994). "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor." Science **264**(5161): 965-968.
- Groom, J. R. and A. D. Luster (2011). "CXCR3 in T cell function." Exp Cell Res **317**(5): 620-631.
- Grunebaum, E., E. Malatzky-Goshen and Y. Shoenfeld (1989). "Natural killer cells and autoimmunity." Immunol Res **8**(4): 292-304.
- Gu, H., H. Maeda, J. J. Moon, J. D. Lord, M. Yoakim, B. H. Nelson and B. G. Neel (2000). "New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." Mol Cell Biol **20**(19): 7109-7120.
- Guy, C. S. and D. A. Vignali (2009). "Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex." Immunol Rev **232**(1): 7-21.
- Habek, M., V. V. Brinar and F. Borovecki (2010). "Genes associated with multiple sclerosis: 15 and counting." Expert Rev Mol Diagn **10**(7): 857-861.
- Hanisch, U. K., S. A. Lyons, M. Prinz, C. Nolte, J. R. Weber, H. Kettenmann and F. Kirchhoff (1997). "Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity." J Biol Chem **272**(46): 28853-28860.
- Haribhai, D., W. Lin, B. Edwards, J. Ziegelbauer, N. H. Salzman, M. R. Carlson, S. H. Li, P. M. Simpson, T. A. Chatila and C. B. Williams (2009). "A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis." J Immunol **182**(6): 3461-3468.
- Harpur, A. G., A. C. Andres, A. Ziemiecki, R. R. Aston and A. F. Wilks (1992). "JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases." Oncogene **7**(7): 1347-1353.
- Haugen, M., J. L. Frederiksen and M. Degen (2014). "B cell follicle-like structures in multiple sclerosis-with focus on the role of B cell activating factor." J Neuroimmunol **273**(1-2): 1-7.
- Hauser, S. L., A. K. Bhan, F. Gilles, M. Kemp, C. Kerr and H. L. Weiner (1986). "Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions." Ann Neurol **19**(6): 578-587.

- Hauser, S. L., J. R. Chan and J. R. Oksenberg (2013). "Multiple sclerosis: Prospects and promise." Ann Neurol **74**(3): 317-327.
- Hedegaard, C. J., M. Krakauer, K. Bendtzen, H. Lund, F. Sellebjerg and C. H. Nielsen (2008). "T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis." Immunology **125**(2): 161-169.
- Hemmer, B., J. J. Archelos and H. P. Hartung (2002). "New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis." Nat Rev Neurosci **3**(4): 291-301.
- Herndler-Brandstetter, D., A. Schwanninger and B. Grubeck-Loebenstein (2007). "CD4+ CD8+ T cells in young and elderly humans. Comment on Macchia I, Gauduin MC, Kaur A, Johnson RP. Expression of CD8alpha identifies a distinct subset of effector memory CD4 T lymphocytes. Immunology 2006; 119:232-42." Immunology **120**(3): 292-294.
- Hestvik, A. L. (2010). "The double-edged sword of autoimmunity: lessons from multiple sclerosis." Toxins (Basel) **2**(4): 856-877.
- Hisanaga, K., M. Asagi, Y. Itoyama and Y. Iwasaki (2001). "Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+ T cells in Parkinson disease." Arch Neurol **58**(10): 1580-1583.
- Hoftberger, R., F. Aboul-Enein, W. Brueck, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, M. Schmidbauer, K. Jellinger and H. Lassmann (2004). "Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions." Brain Pathol **14**(1): 43-50.
- Hoglund, R. A. and A. A. Maghazachi (2014). "Multiple sclerosis and the role of immune cells." World J Exp Med **4**(3): 27-37.
- Holmoy, T. and A. L. Hestvik (2008). "Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause." Curr Opin Infect Dis **21**(3): 271-278.
- Hong, J., N. Li, X. Zhang, B. Zheng and J. Z. Zhang (2005). "Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6449-6454.
- Howe, C. L., D. Ure, J. D. Adelson, R. LaFrance-Corey, A. Johnson and M. Rodriguez (2007). "CD8+ T cells directed against a viral peptide contribute to loss of motor function by disrupting axonal transport in a viral model of fulminant demyelination." J Neuroimmunol **188**(1-2): 13-21.
- Hsieh, C. S. and A. Y. Rudensky (2005). "The role of TCR specificity in naturally arising CD25+ CD4+ regulatory T cell biology." Curr Top Microbiol Immunol **293**: 25-42.
- Hsieh, C. S., Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot and A. Y. Rudensky (2006). "An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires." Nat Immunol **7**(4): 401-410.

Hunt, A. E., F. V. Lali, J. D. Lord, B. H. Nelson, T. Miyazaki, K. J. Tracey and B. M. Foxwell (1999). "Role of interleukin (IL)-2 receptor beta-chain subdomains and Shc in p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p54 MAP kinase (stress-activated protein Kinase/c-Jun N-terminal kinase) activation. IL-2-driven proliferation is independent of p38 and p54 MAP kinase activation." *J Biol Chem* **274**(11): 7591-7597.

Huntington, N. D., N. L. Alves, N. Legrand, A. Lim, H. Strick-Marchand, J. J. Mention, A. Plet, K. Weijer, Y. Jacques, P. D. Becker, C. Guzman, P. Soussan, D. Kremsdorf, H. Spits and J. P. Di Santo (2011). "IL-15 transpresentation promotes both human T-cell reconstitution and T-cell-dependent antibody responses in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(15): 6217-6222.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., D. A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Ivinson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg and S. L. Hauser (2007). "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study." *N Engl J Med* **357**(9): 851-862.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., C. Wellcome Trust Case Control, S. Sawcer, G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt, S. Edkins, E. Gray, D. R. Booth, S. C. Potter, A. Goris, G. Band, A. B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp, A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. Martinelli Boneschi, J. Liddle, H. F. Harbo, M. L. Perez, A. Spurkland, M. J. Waller, M. P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O. T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kempainen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S. J. Bumpstead, L. F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S. E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J. P. Bradfield, D. Brassat, S. A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W. M. Carroll, P. Cavalla, E. G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M. Cossburn, I. Cournu-Rebeix, M. B. Cox, W. Cozen, B. A. Cree, A. H. Cross, D. Cusi, M. J. Daly, E. Davis, P. I. de Bakker, M. Debouverie, B. D'Hooghe M, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S. F. Grant, F. R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H. P. Hartung, R. N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A. G. Kermodé, T. J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J. S. Lechner-Scott, M. A. Leone, V. Leppa, U. Liljedahl, I. L. Bomfim, R. R. Lincoln, J. Link, J. Liu, A. R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macciardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J. L. McCauley, F. Mentch, I. L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K. M. Myhr, P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H. L. Quach, P. P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J. D. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J. P. Rubio, I. M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C. A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R. J. Scott, F. Sellebjerg, K. W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P. M. Sleiman, C. Smestad, P. S. Sorensen, H. B. Sondergaard, J. Stankovich, R. C. Strange, A. M. Sulonen, E. Sundqvist, A. C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor,

J. M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah, M. A. Brown, E. Tronczynska, J. P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H. S. Markus, K. Wang, C. G. Mathew, J. Wason, C. N. Palmer, H. E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A. Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R. C. Trembath, J. Yaouanq, A. C. Viswanathan, H. Zhang, N. W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J. R. Oksenberg, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A. J. Ivanson, P. L. De Jager, L. Peltonen, G. J. Stewart, D. A. Hafler, S. L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly and A. Compston (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." Nature **476**(7359): 214-219.

Investigators, C. T., A. J. Coles, D. A. Compston, K. W. Selmaj, S. L. Lake, S. Moran, D. H. Margolin, K. Norris and P. K. Tandon (2008). "Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis." N Engl J Med **359**(17): 1786-1801.

Iwatani, Y., Y. Hidaka, F. Matsuzuka, K. Kuma and N. Amino (1993). "Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4⁺ CD8⁺ cells and CD3^{lo}TCR alpha beta lo⁻/CD4-CD8⁻ cells, in autoimmune thyroid disease." Clin Exp Immunol **93**(3): 430-436.

Jabri, B., N. P. de Serre, C. Cellier, K. Evans, C. Gache, C. Carvalho, J. F. Mougnot, M. Allez, R. Jian, P. Desreumaux, J. F. Colombel, C. Matuchansky, H. Cugnenc, M. Lopez-Botet, E. Vivier, A. Moretta, A. I. Roberts, E. C. Ebert, D. Guy-Grand, N. Brousse, J. Schmitz and N. Cerf-Bensussan (2000). "Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease." Gastroenterology **118**(5): 867-879.

Jacobsen, M., S. Cepok, E. Quak, M. Happel, R. Gaber, A. Ziegler, S. Schock, W. H. Oertel, N. Sommer and B. Hemmer (2002). "Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients." Brain **125**(Pt 3): 538-550.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.

Ji, Q., A. Perchet and J. M. Goverman (2010). "Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8⁺ T cells expressing dual TCRs." Nat Immunol **11**(7): 628-634.

Jiang, H., S. I. Zhang and B. Pernis (1992). "Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." Science **256**(5060): 1213-1215.

Johnson, A. J., G. L. Suidan, J. McDole and I. Pirko (2007). "The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology?" Int Rev Neurobiol **79**: 73-97.

Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001). "Identification and functional characterization of human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." J Exp Med **193**(11): 1285-1294.

- Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Hohenbeck, M. A. Lerman, A. Naji and A. J. Caton (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." Nat Immunol **2**(4): 301-306.
- Junker, A., J. Ivanidze, J. Malotka, I. Eglmeier, H. Lassmann, H. Wekerle, E. Meinl, R. Hohlfeld and K. Dornmair (2007). "Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions." Brain **130**(Pt 11): 2789-2799.
- Kampa, D. and J. Burnside (2000). "Computational and functional analysis of the putative SH2 domain in Janus Kinases." Biochem Biophys Res Commun **278**(1): 175-182.
- Kamphorst, A. O., P. Guernonprez, D. Dudziak and M. C. Nussenzweig (2010). "Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes." J Immunol **185**(6): 3426-3435.
- Kanabrocki, E. L., M. D. Ryan, D. Lathers, N. Achille, M. R. Young, J. V. Cauteren, S. Foley, M. C. Johnson, N. C. Friedman, G. Siegel and B. A. Nemchausky (2007). "Circadian distribution of serum cytokines in multiple sclerosis." Clin Ter **158**(2): 157-162.
- Kaser, T., W. Gerner, S. E. Hammer, M. Patzl and A. Saalmuller (2008). "Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes." Vet Immunol Immunopathol **125**(1-2): 92-101.
- Kastrukoff, L. F., N. G. Morgan, D. Zecchini, R. White, A. J. Petkau, J. Satoh and D. W. Paty (1998). "A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis." J Neuroimmunol **86**(2): 123-133.
- Kaur, G., J. Trowsdale and L. Fugger (2013). "Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis." Brain **136**(Pt 9): 2657-2676.
- Kebir, H., I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette and A. Prat (2009). "Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis." Ann Neurol **66**(3): 390-402.
- Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher and A. Prat (2007). "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." Nat Med **13**(10): 1173-1175.
- Keir, M. E., M. J. Butte, G. J. Freeman and A. H. Sharpe (2008). "PD-1 and its ligands in tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **26**: 677-704.
- Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce and J. J. Peschon (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." J Exp Med **191**(5): 771-780.
- Kieseier, B. C. (2011). "The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis." CNS Drugs **25**(6): 491-502.

- Kinnear, G., N. D. Jones and K. J. Wood (2013). "Costimulation blockade: current perspectives and implications for therapy." Transplantation **95**(4): 527-535.
- Kitchen, S. G., N. R. Jones, S. LaForge, J. K. Whitmire, B. A. Vu, Z. Galic, D. G. Brooks, S. J. Brown, C. M. Kitchen and J. A. Zack (2004). "CD4 on CD8(+) T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8727-8732.
- Kitchen, S. G., S. LaForge, V. P. Patel, C. M. Kitchen, M. C. Miceli and J. A. Zack (2002). "Activation of CD8 T cells induces expression of CD4, which functions as a chemotactic receptor." Blood **99**(1): 207-212.
- Kiu, H. and S. E. Nicholson (2012). "Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways." Growth Factors **30**(2): 88-106.
- Kivisakk, P., D. Matusevicius, B. He, M. Soderstrom, S. Fredrikson and H. Link (1998). "IL-15 mRNA expression is up-regulated in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis (MS)." Clin Exp Immunol **111**(1): 193-197.
- Kleinewietfeld, M., A. Manzel, J. Titze, H. Kvakana, N. Yosef, R. A. Linker, D. N. Muller and D. A. Hafler (2013). "Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells." Nature **496**(7446): 518-522.
- Koch, U. and F. Radtke (2011). "Mechanisms of T cell development and transformation." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 539-562.
- Koh, D. R., W. P. Fung-Leung, A. Ho, D. Gray, H. Acha-Orbea and T. W. Mak (1992). "Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice." Science **256**(5060): 1210-1213.
- Koka, R., P. R. Burkett, M. Chien, S. Chai, F. Chan, J. P. Lodolce, D. L. Boone and A. Ma (2003). "Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice." J Exp Med **197**(8): 977-984.
- Kolls, J. K. (2013). "CD4(+) T-cell subsets and host defense in the lung." Immunol Rev **252**(1): 156-163.
- Kremenchutzky, M., G. P. Rice, J. Baskerville, D. M. Wingerchuk and G. C. Ebers (2006). "The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease." Brain **129**(Pt 3): 584-594.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig and H. von Boehmer (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." Nat Immunol **6**(12): 1219-1227.

- Kroenke, M. A., T. J. Carlson, A. V. Andjelkovic and B. M. Segal (2008). "IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition." J Exp Med **205**(7): 1535-1541.
- Kroner, A., M. Mehling, B. Hemmer, P. Rieckmann, K. V. Toyka, M. Maurer and H. Wiendl (2005). "A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis." Ann Neurol **58**(1): 50-57.
- Kuczynski, S., H. Winiarska, M. Abramczyk, K. Szczawinska, B. Wierusz-Wysocka and M. Dworacka (2005). "IL-15 is elevated in serum patients with type 1 diabetes mellitus." Diabetes Res Clin Pract **69**(3): 231-236.
- Kuhns, M. S. and H. B. Badgandi (2012). "Piecing together the family portrait of TCR-CD3 complexes." Immunol Rev **250**(1): 120-143.
- Kurowska, M., W. Rudnicka, D. Maslinska and W. Maslinski (2002). "Expression of IL-15 and IL-15 receptor isoforms in select structures of human fetal brain." Ann N Y Acad Sci **966**: 441-445.
- Kurys, G., Y. Tagaya, R. Bamford, J. A. Hanover and T. A. Waldmann (2000). "The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15." J Biol Chem **275**(39): 30653-30659.
- Kwilasz, A. J., P. M. Grace, P. Serbedzija, S. F. Maier and L. R. Watkins (2015). "The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases." Neuropharmacology **96**(Pt A): 55-69.
- Lackmann, M., A. G. Harpur, A. C. Oates, R. J. Mann, A. Gabriel, W. Meutermans, P. F. Alewood, I. M. Kerr, G. R. Stark and A. F. Wilks (1998). "Biomolecular interaction analysis of IFN gamma-induced signaling events in whole-cell lysates: prevalence of latent STAT1 in high-molecular weight complexes." Growth Factors **16**(1): 39-51.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2000). "Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells." Science **290**(5489): 92-97.
- Larochelle, C., J. I. Alvarez and A. Prat (2011). "How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?" FEBS Lett **585**(23): 3770-3780.
- Larochelle, C., M. A. Lecuyer, J. I. Alvarez, M. Charabati, O. Saint-Laurent, S. Ghannam, H. Kebir, K. Flanagan, T. Yednock, P. Duquette, N. Arbour and A. Prat (2015). "Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation." Ann Neurol **78**(1): 39-53.

Lathrop, S. K., S. M. Bloom, S. M. Rao, K. Nutsch, C. W. Lio, N. Santacruz, D. A. Peterson, T. S. Stappenbeck and C. S. Hsieh (2011). "Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota." Nature **478**(7368): 250-254.

Leonard, W. J. (2001). "Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction." Int J Hematol **73**(3): 271-277.

Li, R., A. Rezk, Y. Miyazaki, E. Hilgenberg, H. Touil, P. Shen, C. S. Moore, L. Michel, F. Althekair, S. Rajasekharan, J. L. Gommerman, A. Prat, S. Fillatreau, A. Bar-Or and B. c. i. M. S. T. Canadian (2015). "Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy." Sci Transl Med **7**(310): 310ra166.

Li, Y., N. Chu, A. Hu, B. Gran, A. Rostami and G. X. Zhang (2007). "Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia." Brain **130**(Pt 2): 490-501.

Li, Y., Y. Yin and R. A. Mariuzza (2013). "Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation." Front Immunol **4**: 206.

Liao, W., V. Pham, L. Liu, M. Riazifar, E. J. Pone, S. X. Zhang, F. Ma, M. Lu, C. M. Walsh and W. Zhao (2015). "Mesenchymal stem cells engineered to express selectin ligands and IL-10 exert enhanced therapeutic efficacy in murine experimental autoimmune encephalomyelitis." Biomaterials **77**: 87-97.

Liblau, R. S., F. S. Wong, L. T. Mars and P. Santamaria (2002). "Autoreactive CD8 T cells in organ-specific autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention." Immunity **17**(1): 1-6.

Lin, J. X., T. S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J. A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E. T. Bloom, J. Mietz, S. John and et al. (1995). "The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15." Immunity **2**(4): 331-339.

Lin, L., J. Couturier, X. Yu, M. A. Medina, C. A. Kozinetz and D. E. Lewis (2014). "Granzyme B secretion by human memory CD4 T cells is less strictly regulated compared to memory CD8 T cells." BMC Immunol **15**: 36.

Link, H. (1998). "The cytokine storm in multiple sclerosis." Mult Scler **4**(1): 12-15.

Linker, R. A., D. H. Lee, S. Ryan, A. M. van Dam, R. Conrad, P. Bista, W. Zeng, X. Hronowsky, A. Buko, S. Chollate, G. Ellrichmann, W. Bruck, K. Dawson, S. Goelz, S. Wiese, R. H. Scannevin, M. Lukashev and R. Gold (2011). "Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway." Brain **134**(Pt 3): 678-692.

Linker, R. A., M. Sendtner and R. Gold (2005). "Mechanisms of axonal degeneration in EAE-lessons from CNTF and MHC I knockout mice." J Neurol Sci **233**(1-2): 167-172.

- Liu, G. Z., L. B. Fang, P. Hjelmstrom and X. G. Gao (2007). "Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis." Mult Scler **13**(2): 149-155.
- Liu, G. Z. and X. G. Gao (2007). "[Memory T cell subsets in peripheral blood of patients with multiple sclerosis]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **87**(39): 2750-2752.
- Liu, M. F., C. R. Wang, L. L. Fung and C. R. Wu (2004). "Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus." Scand J Immunol **59**(2): 198-202.
- Liu, Z., K. Geboes, S. Colpaert, G. R. D'Haens, P. Rutgeerts and J. L. Ceuppens (2000). "IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production." J Immunol **164**(7): 3608-3615.
- Livak, F., M. Tourigny, D. G. Schatz and H. T. Petrie (1999). "Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development." J Immunol **162**(5): 2575-2580.
- Longhi, M. S., Y. Ma, D. P. Bogdanos, P. Cheeseman, G. Mieli-Vergani and D. Vergani (2004). "Impairment of CD4(+)/CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease." J Hepatol **41**(1): 31-37.
- Lopez-Diego, R. S. and H. L. Weiner (2008). "Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis--a multifaceted adversary." Nat Rev Drug Discov **7**(11): 909-925.
- Lovett-Racke, A. E., Y. Yang and M. K. Racke (2011). "Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis?" Biochim Biophys Acta **1812**(2): 246-251.
- Lublin, F. D., R. L. Knobler, B. Kalman, M. Goldhaber, J. Marini, M. Perrault, C. D'Imperio, J. Joseph, S. S. Alkan and R. Korngold (1993). "Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis." Autoimmunity **16**(4): 267-274.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." Ann Neurol **47**(6): 707-717.
- Lucet, I. S., E. Fantino, M. Styles, R. Bamert, O. Patel, S. E. Broughton, M. Walter, C. J. Burns, H. Treutlein, A. F. Wilks and J. Rossjohn (2006). "The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor." Blood **107**(1): 176-183.
- Mackay, C. R. (1993). "Immunological memory." Adv Immunol **53**: 217-265.
- Maghazachi, A. A. (2000). "Chemokines, G proteins and natural killer cells." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **48**(2): 65-72.
- Maghazachi, A. A. (2005). "Insights into seven and single transmembrane-spanning domain receptors and their signaling pathways in human natural killer cells." Pharmacol Rev **57**(3): 339-357.

Maghazachi, A. A. (2010). "Role of chemokines in the biology of natural killer cells." Curr Top Microbiol Immunol **341**: 37-58.

Maghazachi, A. A. (2013). "On the role of natural killer cells in neurodegenerative diseases." Toxins (Basel) **5**(2): 363-375.

Maghazachi, A. A. and A. Al-Aoukaty (1998). "Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer." FASEB J **12**(11): 913-924.

Magliozzi, R., O. Howell, A. Vora, B. Serafini, R. Nicholas, M. Puopolo, R. Reynolds and F. Aloisi (2007). "Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology." Brain **130**(Pt 4): 1089-1104.

Maiuri, L., C. Ciacci, S. Auricchio, V. Brown, S. Quarantino and M. Londei (2000). "Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease." Gastroenterology **119**(4): 996-1006.

Major, E. O. (2010). "Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies." Annu Rev Med **61**: 35-47.

Malmstrom, C., J. Lycke, S. Haghighi, O. Andersen, L. Carlsson, H. Wadenvik and B. Olsson (2008). "Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF." J Neuroimmunol **196**(1-2): 159-165.

Mao, X., Z. Ren, G. N. Parker, H. Sondermann, M. A. Pastorello, W. Wang, J. S. McMurray, B. Demeler, J. E. Darnell, Jr. and X. Chen (2005). "Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding." Mol Cell **17**(6): 761-771.

Marks-Konczalik, J., S. Dubois, J. M. Losi, H. Sabzevari, N. Yamada, L. Feigenbaum, T. A. Waldmann and Y. Tagaya (2000). "IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11445-11450.

Mars, L. T., P. Saikali, R. S. Liblau and N. Arbour (2011). "Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 151-161.

Mathey, E. K., T. Derfuss, M. K. Storch, K. R. Williams, K. Hales, D. R. Woolley, A. Al-Hayani, S. N. Davies, M. N. Rasband, T. Olsson, A. Moldenhauer, S. Velhin, R. Hohlfeld, E. Meinl and C. Linington (2007). "Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury." J Exp Med **204**(10): 2363-2372.

Matsui, M., H. Fukuyama, I. Akiguchi and M. Kameyama (1989). "Circulating CD4+CD8+ cells in myasthenia gravis: supplementary immunological parameter for long-term prognosis." J Neurol **236**(6): 329-335.

- Matsumoto, M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, A. Kallies, S. L. Nutt, S. Sakaguchi, K. Takeda, T. Kurosaki and Y. Baba (2014). "Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation." Immunity **41**(6): 1040-1051.
- Matsushita, T., K. Yanaba, J. D. Bouaziz, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2008). "Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression." J Clin Invest **118**(10): 3420-3430.
- Mazzi, V. (2015). "Cytokines and chemokines in multiple sclerosis." Clin Ter **166**(1): e62-66.
- McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea and D. J. Cua (2009). "The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo." Nat Immunol **10**(3): 314-324.
- McGraw, C. A. and F. D. Lublin (2013). "Interferon beta and glatiramer acetate therapy." Neurotherapeutics **10**(1): 2-18.
- McInnes, I. B., J. al-Mughales, M. Field, B. P. Leung, F. P. Huang, R. Dixon, R. D. Sturrock, P. C. Wilkinson and F. Y. Liew (1996). "The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis." Nat Med **2**(2): 175-182.
- McInnes, I. B. and J. A. Gracie (2004). "Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases." Curr Opin Pharmacol **4**(4): 392-397.
- McInnes, I. B., J. A. Gracie, M. Harnett, W. Harnett and F. Y. Liew (2003). "New strategies to control inflammatory synovitis: interleukin 15 and beyond." Ann Rheum Dis **62 Suppl 2**: ii51-54.
- McQualter, J. L., R. Darwiche, C. Ewing, M. Onuki, T. W. Kay, J. A. Hamilton, H. H. Reid and C. C. Bernard (2001). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis." J Exp Med **194**(7): 873-882.
- Meazza, R., S. Verdiani, R. Biassoni, M. Coppolecchia, A. Gaggero, A. M. Orengo, M. P. Colombo, B. Azzarone and S. Ferrini (1996). "Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines." Oncogene **12**(10): 2187-2192.
- Mehling, M., T. A. Johnson, J. Antel, L. Kappos and A. Bar-Or (2011). "Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis." Neurology **76**(8 Suppl 3): S20-27.
- Melen, K., L. Kinnunen and I. Julkunen (2001). "Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs." J Biol Chem **276**(19): 16447-16455.

- Mellergard, J., M. Edstrom, M. Vrethem, J. Ernerudh and C. Dahle (2010). "Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid." Mult Scler **16**(2): 208-217.
- Mention, J. J., M. Ben Ahmed, B. Begue, U. Barbe, V. Verkarre, V. Asnafi, J. F. Colombel, P. H. Cugnenc, F. M. Ruemmele, E. McIntyre, N. Brousse, C. Cellier and N. Cerf-Bensussan (2003). "Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease." Gastroenterology **125**(3): 730-745.
- Mertens, C., M. Zhong, R. Krishnaraj, W. Zou, X. Chen and J. E. Darnell, Jr. (2006). "Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain." Genes Dev **20**(24): 3372-3381.
- Mills, J. A. (1994). "Systemic lupus erythematosus." N Engl J Med **330**(26): 1871-1879.
- Milo, R. and E. Kahana (2010). "Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment." Autoimmun Rev **9**(5): A387-394.
- Miossec, P., T. Korn and V. K. Kuchroo (2009). "Interleukin-17 and type 17 helper T cells." N Engl J Med **361**(9): 888-898.
- Miranda-Carus, M. E., A. Balsa, M. Benito-Miguel, C. Perez de Ayala and E. Martin-Mola (2004). "IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate." J Immunol **173**(2): 1463-1476.
- Mishra, A., L. Sullivan and M. A. Caligiuri (2014). "Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer." Clin Cancer Res **20**(8): 2044-2050.
- Miyazaki, T., A. Kawahara, H. Fujii, Y. Nakagawa, Y. Minami, Z. J. Liu, I. Oishi, O. Silvennoinen, B. A. Witthuhn, J. N. Ihle and et al. (1994). "Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits." Science **266**(5187): 1045-1047.
- Miyazaki, Y., R. Li, A. Rezk, H. Misirliyan, C. Moore, N. Farooqi, M. Solis, L. G. Goiry, O. de Faria Junior, V. D. Dang, D. Colman, A. S. Dhaunchak, J. Antel, J. Gommerman, A. Prat, S. Fillatreau, A. Bar-Or, C. M. N. E. T. G. i. C. Autoimmunity and M. C. B. c. i. M. Team (2014). "A novel microRNA-132-sirtuin-1 axis underlies aberrant B-cell cytokine regulation in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis [corrected]." PLoS One **9**(8): e105421.
- Mizuki, M., S. Tagawa, T. Machii, M. Shibano, E. Tatsumi, K. Tsubaki, H. Tako, A. Yokohama, S. Satou, J. Nojima, T. Hirota and T. Kitani (1998). "Phenotypical heterogeneity of CD4+CD8+ double-positive chronic T lymphoid leukemia." Leukemia **12**(4): 499-504.
- Mizutani, H., S. Katagiri, K. Uejima, M. Ohnishi, T. Tamaki, Y. Kanayama, T. Tsubakio, Y. Kurata, T. Yonezawa and S. Tarui (1985). "T-cell abnormalities in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: the presence of OKT4+8+ cells." Scand J Haematol **35**(2): 233-239.

Mohebiany, A. N. (2011). Interleukin-15 in the pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. master, Université de Montréal.

Molnarfi, N., U. Schulze-Topphoff, M. S. Weber, J. C. Patarroyo, T. Prod'homme, M. Varrin-Doyer, A. Shetty, C. Linington, A. J. Slavin, J. Hidalgo, D. E. Jenne, H. Wekerle, R. A. Sobel, C. C. Bernard, M. J. Shlomchik and S. S. Zamvil (2013). "MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies." J Exp Med **210**(13): 2921-2937.

Montag, D. T. and M. T. Lotze (2006). "Rapid flow cytometric measurement of cytokine-induced phosphorylation pathways [CIPP] in human peripheral blood leukocytes." Clin Immunol **121**(2): 215-226.

Montero, E., G. Nussbaum, J. F. Kaye, R. Perez, A. Lage, A. Ben-Nun and I. R. Cohen (2004). "Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies." J Autoimmun **23**(1): 1-7.

Monteyne, P., M. P. Van Antwerpen and C. J. Sindic (1999). "Expression of costimulatory molecules and cytokines in CSF and peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients." Acta Neurol Belg **99**(1): 11-20.

Moreno, M., L. Negrotto, J. Rio, R. Moubarak, I. Martin, M. F. Bustamante, J. X. Comella, A. Vidal-Jordana, J. Perez-Boza, X. Montalban and M. Comabella (2014). "Activation-induced cell death in T lymphocytes from multiple sclerosis patients." J Neuroimmunol **272**(1-2): 51-55.

Mortier, E., T. Woo, R. Advincula, S. Gozalo and A. Ma (2008). "IL-15/Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation." J Exp Med **205**(5): 1213-1225.

Munschauer, F. E., C. Stewart, L. Jacobs, S. Kaba, Z. Ghorishi, S. J. Greenberg and D. Cookfair (1993). "Circulating CD3+ CD4+ CD8+ T lymphocytes in multiple sclerosis." J Clin Immunol **13**(2): 113-118.

Murray, P. D., K. D. Pavelko, J. Leibowitz, X. Lin and M. Rodriguez (1998). "CD4(+) and CD8(+) T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis." J Virol **72**(9): 7320-7329.

Nascimbeni, M., S. Pol and B. Saunier (2011). "Distinct CD4+ CD8+ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C." PLoS One **6**(5): e20145.

Nascimbeni, M., E. C. Shin, L. Chiriboga, D. E. Kleiner and B. Rehermann (2004). "Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions." Blood **104**(2): 478-486.

- Ndubuisi, M. I., G. G. Guo, V. A. Fried, J. D. Etlinger and P. B. Sehgal (1999). "Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer?" J Biol Chem **274**(36): 25499-25509.
- Neumann, H., I. M. Medana, J. Bauer and H. Lassmann (2002). "Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases." Trends Neurosci **25**(6): 313-319.
- Nishiwaki, T., K. Ina, H. Goto, O. Watanabe, T. Tsuzuki, R. Furuta, T. Ando, K. Hibi and K. Kusugami (2005). "Possible involvement of the interleukin-15 and interleukin-15 receptor system in a heightened state of lamina propria B cell activation and differentiation in patients with inflammatory bowel disease." J Gastroenterol **40**(2): 128-136.
- Noack, M. and P. Miossec (2014). "Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases." Autoimmun Rev **13**(6): 668-677.
- Noor, S. and E. H. Wilson (2012). "Role of C-C chemokine receptor type 7 and its ligands during neuroinflammation." J Neuroinflammation **9**: 77.
- Oberg, L., S. Johansson, J. Michaelsson, E. Tomasello, E. Vivier, K. Karre and P. Hoglund (2004). "Loss or mismatch of MHC class I is sufficient to trigger NK cell-mediated rejection of resting lymphocytes in vivo - role of KARAP/DAP12-dependent and -independent pathways." Eur J Immunol **34**(6): 1646-1653.
- Onu, A., T. Pohl, H. Krause and S. Bulfone-Paus (1997). "Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms." J Immunol **158**(1): 255-262.
- Ota, N., T. J. Brett, T. L. Murphy, D. H. Fremont and K. M. Murphy (2004). "N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation." Nat Immunol **5**(2): 208-215.
- Ou-Yang, C. W., M. Zhu, D. M. Fuller, S. A. Sullivan, M. I. Chuck, S. Ogden, Q. J. Li and W. Zhang (2012). "Role of LAT in the granule-mediated cytotoxicity of CD8 T cells." Mol Cell Biol **32**(14): 2674-2684.
- Ousman, S. S., B. H. Tomooka, J. M. van Noort, E. F. Wawrousek, K. C. O'Connor, D. A. Hafler, R. A. Sobel, W. H. Robinson and L. Steinman (2007). "Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination." Nature **448**(7152): 474-479.
- Overgaard, N. H., J. W. Jung, R. J. Steptoe and J. W. Wells (2015). "CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage?" J Leukoc Biol **97**(1): 31-38.
- Paliard, X., R. W. Malefijt, J. E. de Vries and H. Spits (1988). "Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4+ T-cell clones." Nature **335**(6191): 642-644.
- Panitch, H. S., R. L. Hirsch, A. S. Haley and K. P. Johnson (1987). "Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon." Lancet **1**(8538): 893-895.

- Panitch, H. S., R. L. Hirsch, J. Schindler and K. P. Johnson (1987). "Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system." Neurology **37**(7): 1097-1102.
- Parel, Y., M. Aurrand-Lions, A. Scheja, J. M. Dayer, E. Roosnek and C. Chizzolini (2007). "Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis." Arthritis Rheum **56**(10): 3459-3467.
- Parel, Y. and C. Chizzolini (2004). "CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease." Autoimmun Rev **3**(3): 215-220.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
- Park, Y. B., D. S. Kim, W. K. Lee, C. H. Suh and S. K. Lee (1999). "Elevated serum interleukin-15 levels in systemic lupus erythematosus." Yonsei Med J **40**(4): 343-348.
- Pashenkov, M., M. Mustafa, P. Kivisakk and H. Link (1999). "Levels of interleukin-15-expressing blood mononuclear cells are elevated in multiple sclerosis." Scand J Immunol **50**(3): 302-308.
- Peng, H., M. Guerau-de-Arellano, V. B. Mehta, Y. Yang, D. J. Huss, T. L. Papenfuss, A. E. Lovett-Racke and M. K. Racke (2012). "Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling." J Biol Chem **287**(33): 28017-28026.
- Pereno, R., J. Giron-Michel, A. Gaggero, E. Cazes, R. Meazza, M. Monetti, E. Monaco, Z. Mishal, C. Jasmin, F. Indiveri, S. Ferrini and B. Azzarone (2000). "IL-15/IL-15Ralpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha." Oncogene **19**(45): 5153-5162.
- Petelin, Z., V. Brinar, D. Petravic, N. Zurak, K. Dubravcic and D. Batinic (2004). "CD95/Fas expression on peripheral blood T lymphocytes in patients with multiple sclerosis: effect of high-dose methylprednisolone therapy." Clin Neurol Neurosurg **106**(3): 259-262.
- Petrovic-Rackov, L. and N. Pejnovic (2006). "Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis." Clin Rheumatol **25**(4): 448-452.
- Phillips, J. T. and R. J. Fox (2013). "BG-12 in multiple sclerosis." Semin Neurol **33**(1): 56-65.
- Pinheiro, D., Y. Singh, C. R. Grant, R. C. Appleton, F. Sacchini, K. R. Walker, A. H. Chadbourne, C. A. Palmer, E. Armitage-Chan, I. Thompson, L. Williamson, F. Cunningham and O. A. Garden (2011). "Phenotypic and functional characterization of a CD4(+)

CD25(high) FOXP3(high) regulatory T-cell population in the dog." Immunology **132**(1): 111-122.

Pittet, C. L., J. Newcombe, A. Prat and N. Arbour (2011). "Human brain endothelial cells endeavor to immunoregulate CD8 T cells via PD-1 ligand expression in multiple sclerosis." J Neuroinflammation **8**: 155.

Planas, R., R. Martin and M. Sospedra (2014). "Long-term safety and efficacy of natalizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: impact on quality of life." Patient Relat Outcome Meas **5**: 25-33.

Polman, C. H., P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandrock and A. Investigators (2006). "A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **354**(9): 899-910.

Prat, A., K. Biernacki and J. P. Antel (2005). "Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon beta and copolymer-1." J Autoimmun **24**(2): 119-124.

Prince, H. E., J. Golding and J. York (1994). "Characterization of circulating CD4+ CD8+ lymphocytes in healthy individuals prompted by identification of a blood donor with a markedly elevated level of CD4+ CD8+ lymphocytes." Clin Diagn Lab Immunol **1**(5): 597-605.

Putheti, P., A. Pettersson, M. Soderstrom, H. Link and Y. M. Huang (2004). "Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs." J Clin Immunol **24**(2): 155-161.

Quandt, D., K. Rothe, R. Scholz, C. W. Baerwald and U. Wagner (2014). "Peripheral CD4CD8 double positive T cells with a distinct helper cytokine profile are increased in rheumatoid arthritis." PLoS One **9**(3): e93293.

Quinn, L. S., B. G. Anderson, R. H. Drivdahl, B. Alvarez and J. M. Argiles (2002). "Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: implications for treatment of muscle wasting disorders." Exp Cell Res **280**(1): 55-63.

Raimondi, G., M. S. Turner, A. W. Thomson and P. A. Morel (2007). "Naturally occurring regulatory T cells: recent insights in health and disease." Crit Rev Immunol **27**(1): 61-95.

Rangarajan, S. and R. A. Mariuzza (2014). "T cell receptor bias for MHC: co-evolution or co-receptors?" Cell Mol Life Sci.

Ratts, R. B., N. J. Karandikar, R. Z. Hussain, J. Choy, S. C. Northrop, A. E. Lovett-Racke and M. K. Racke (2006). "Phenotypic characterization of autoreactive T cells in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **178**(1-2): 100-110.

- Rengarajan, J., S. J. Szabo and L. H. Glimcher (2000). "Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization." Immunol Today **21**(10): 479-483.
- Rentzos, M., C. Nikolaou, E. Andreadou, G. P. Paraskevas, A. Rombos, M. Zoga, A. Tsoutsou, F. Boufidou, E. Kapaki and D. Vassilopoulos (2007). "Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease." Acta Neurol Scand **116**(6): 374-379.
- Rentzos, M. and A. Rombos (2012). "The role of IL-15 in central nervous system disorders." Acta Neurol Scand **125**(2): 77-82.
- Rentzos, M., M. Zoga, G. P. Paraskevas, E. Kapaki, A. Rombos, C. Nikolaou, A. Tsoutsou and D. Vassilopoulos (2006). "IL-15 is elevated in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." J Geriatr Psychiatry Neurol **19**(2): 114-117.
- Rosser, E. C., K. Oleinika, S. Tonon, R. Doyle, A. Bosma, N. A. Carter, K. A. Harris, S. A. Jones, N. Klein and C. Mauri (2014). "Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production." Nat Med **20**(11): 1334-1339.
- Russi, A. E. and M. A. Brown (2014). "The meninges: new therapeutic targets for multiple sclerosis." Transl Res.
- Sad, S., R. Marcotte and T. R. Mosmann (1995). "Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines." Immunity **2**(3): 271-279.
- Saharinen, P., K. Takaluoma and O. Silvennoinen (2000). "Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain." Mol Cell Biol **20**(10): 3387-3395.
- Saharinen, P., M. Vihinen and O. Silvennoinen (2003). "Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain." Mol Biol Cell **14**(4): 1448-1459.
- Saikali, P., J. P. Antel, J. Newcombe, Z. Chen, M. Freedman, M. Blain, R. Cayrol, A. Prat, J. A. Hall and N. Arbour (2007). "NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis." J Neurosci **27**(5): 1220-1228.
- Saikali, P., J. P. Antel, C. L. Pittet, J. Newcombe and N. Arbour (2010). "Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis." J Immunol **185**(10): 5693-5703.
- Sala, P., E. Tonutti, C. Feruglio, F. Florian and A. Colombatti (1993). "Persistent expansions of CD4+ CD8+ peripheral blood T cells." Blood **82**(5): 1546-1552.
- Sallusto, F., J. Geginat and A. Lanzavecchia (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol **22**: 745-763.

Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-712.

Sandau, M. M., K. S. Schluns, L. Lefrancois and S. C. Jameson (2004). "Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells." J Immunol **173**(11): 6537-6541.

Sarchielli, P., M. Zaffaroni, A. Floridi, L. Greco, A. Candelieri, A. Mattioni, S. Tenaglia, M. Di Filippo and P. Calabresi (2007). "Production of brain-derived neurotrophic factor by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis treated with glatiramer acetate, interferon-beta 1a, and high doses of immunoglobulins." Mult Scler **13**(3): 313-331.

Sarrabayrouse, G., C. Bossard, J. M. Chauvin, A. Jarry, G. Meurette, E. Quevrain, C. Bridonneau, L. Preisser, K. Asehnoune, N. Labarriere, F. Altare, H. Sokol and F. Jotereau (2014). "CD4CD8alpha lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease." PLoS Biol **12**(4): e1001833.

Scannevin, R. H., S. Chollate, M. Y. Jung, M. Shackett, H. Patel, P. Bista, W. Zeng, S. Ryan, M. Yamamoto, M. Lukashev and K. J. Rhodes (2012). "Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway." J Pharmacol Exp Ther **341**(1): 274-284.

Scanzello, C. R., E. Umoh, F. Pessler, C. Diaz-Torne, T. Miles, E. Dicarolo, H. G. Potter, L. Mandl, R. Marx, S. Rodeo, S. R. Goldring and M. K. Crow (2009). "Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease." Osteoarthritis Cartilage **17**(8): 1040-1048.

Schluns, K. S., E. C. Nowak, A. Cabrera-Hernandez, L. Puddington, L. Lefrancois and H. L. Aguila (2004). "Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5616-5621.

Schneider, R., A. N. Mohebiany, I. Ifergan, D. Beauseigle, P. Duquette, A. Prat and N. Arbour (2011). "B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients." J Immunol **187**(8): 4119-4128.

Segal, B. M. (2014). "Stage-specific immune dysregulation in multiple sclerosis." J Interferon Cytokine Res **34**(8): 633-640.

Segal, B. M., C. S. Constantinescu, A. Raychaudhuri, L. Kim, R. Fidelus-Gort, L. H. Kasper and M. S. I. Ustekinumab (2008). "Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study." Lancet Neurol **7**(9): 796-804.

Senju, M., K. C. Wu, Y. R. Mahida and D. P. Jewell (1991). "Coexpression of CD4 and CD8 on peripheral blood T cells and lamina propria T cells in inflammatory bowel disease by two colour immunofluorescence and flow cytometric analysis." Gut **32**(8): 918-922.

Serafini, B., B. Rosicarelli, R. Magliozzi, E. Stigliano, E. Capello, G. L. Mancardi and F. Aloisi (2006). "Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells." J Neuropathol Exp Neurol **65**(2): 124-141.

Sharief, M. K. and E. J. Thompson (1993). "Correlation of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor with clinical activity of multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **56**(2): 169-174.

Shen, P., T. Roch, V. Lampropoulou, R. A. O'Connor, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, V. D. Dang, Y. Jaimes, C. Daridon, R. Li, L. Jouneau, P. Boudinot, S. Wilantri, I. Sakwa, Y. Miyazaki, M. D. Leech, R. C. McPherson, S. Wirtz, M. Neurath, K. Hoehlig, E. Meinl, A. Grutzkau, J. R. Grun, K. Horn, A. A. Kuhl, T. Dorner, A. Bar-Or, S. H. Kaufmann, S. M. Anderton and S. Fillatreau (2014). "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases." Nature **507**(7492): 366-370.

Shuai, K. and B. Liu (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." Nat Rev Immunol **3**(11): 900-911.

Silva, M. A., J. Menezes, C. Deslandres and E. G. Seidman (2005). "Anti-inflammatory role of interleukin-15 in Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **11**(3): 219-230.

Singer, A. (2002). "New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision." Curr Opin Immunol **14**(2): 207-215.

Singer, A., S. Adoro and J. H. Park (2008). "Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice." Nat Rev Immunol **8**(10): 788-801.

Singer, A. and R. Bosselut (2004). "CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision." Adv Immunol **83**: 91-131.

Sinha, S., F. R. Itani and N. J. Karandikar (2014). "Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells." Immunol Res **59**(1-3): 254-265.

Skulina, C., S. Schmidt, K. Dornmair, H. Babbe, A. Roers, K. Rajewsky, H. Wekerle, R. Hohlfeld and N. Goebels (2004). "Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2428-2433.

Sorensen, T. L., C. Trebst, P. Kivisakk, K. L. Klaege, A. Majmudar, R. Ravid, H. Lassmann, D. B. Olsen, R. M. Strieter, R. M. Ransohoff and F. Sellebjerg (2002). "Multiple sclerosis: a

study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system." J Neuroimmunol **127**(1-2): 59-68.

Spear, P., M. R. Wu, M. L. Sentman and C. L. Sentman (2013). "NKG2D ligands as therapeutic targets." Cancer Immun **13**: 8.

Steel, J. C., T. A. Waldmann and J. C. Morris (2012). "Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer." Trends Pharmacol Sci **33**(1): 35-41.

Steinman, L. (2001). "Multiple sclerosis: a two-stage disease." Nat Immunol **2**(9): 762-764.

Stone, K. P., A. J. Kastin and W. Pan (2011). "NFkB is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia." Cell Physiol Biochem **28**(1): 115-124.

Storch, M. K., S. Piddlesden, M. Haltia, M. Iivanainen, P. Morgan and H. Lassmann (1998). "Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination." Ann Neurol **43**(4): 465-471.

Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris and J. M. Goverman (2008). "Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells." Nat Med **14**(3): 337-342.

Strunk, T., S. Bubel, B. Mascher, P. Schlenke, H. Kirchner and K. P. Wandinger (2000). "Increased numbers of CCR5+ interferon-gamma- and tumor necrosis factor-alpha-secreting T lymphocytes in multiple sclerosis patients." Ann Neurol **47**(2): 269-273.

Sullivan, Y. B., A. L. Landay, J. A. Zack, S. G. Kitchen and L. Al-Harhi (2001). "Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells." Immunology **103**(3): 270-280.

Sun, J. M., L. Z. Sun, J. Liu, B. H. Su and L. Shi (2013). "Serum interleukin-15 levels are associated with severity of pain in patients with knee osteoarthritis." Dis Markers **35**(3): 203-206.

Suni, M. A., S. A. Ghanekar, D. W. Houck, H. T. Maecker, S. B. Wormsley, L. J. Picker, R. B. Moss and V. C. Maino (2001). "CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens." Eur J Immunol **31**(8): 2512-2520.

Tagaya, Y., G. Kurys, T. A. Thies, J. M. Losi, N. Azimi, J. A. Hanover, R. N. Bamford and T. A. Waldmann (1997). "Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14444-14449.

Tanchot, C. and B. Rocha (1998). "The organization of mature T-cell pools." Immunol Today **19**(12): 575-579.

Tang, F., B. Sally, C. Ciszewski, V. Abadie, S. A. Curran, V. Groh, O. Fitzgerald, R. J. Winchester and B. Jabri (2013). "Interleukin 15 primes natural killer cells to kill via NKG2D and cPLA2 and this pathway is active in psoriatic arthritis." PLoS One **8**(9): e76292.

Taylor, J. G. and J. G. Gribben (2015). "Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects." Semin Cancer Biol.

Tonutti, E., P. Sala, C. Feruglio, Z. Yin and A. Colombatti (1994). "Phenotypic heterogeneity of persistent expansions of CD4⁺ CD8⁺ T cells." Clin Immunol Immunopathol **73**(3): 312-320.

Tournier, E., C. Laurent, M. Thomas, N. Meyer, R. Viraben, P. Brousset and L. Lamant (2014). "Double-positive CD4/CD8 mycosis fungoides: a rarely reported immunohistochemical profile." J Cutan Pathol **41**(1): 58-62.

Trabattoni, D., M. Saresella, M. Pavec, I. Marventano, L. Mendozzi, M. Rovaris, D. Caputo, M. Borelli and M. Clerici (2009). "Costimulatory pathways in multiple sclerosis: distinctive expression of PD-1 and PD-L1 in patients with different patterns of disease." J Immunol **183**(8): 4984-4993.

Tutaj, M. and M. Szczepanik (2007). "Epicutaneous (EC) immunization with myelin basic protein (MBP) induces TCR α beta⁺ CD4⁺ CD8⁺ double positive suppressor cells that protect from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Autoimmun **28**(4): 208-215.

Tzartos, J. S., M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri and L. Fugger (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." Am J Pathol **172**(1): 146-155.

Vaknin-Dembinsky, A., S. D. Brass, R. Gandhi and H. L. Weiner (2008). "Membrane bound IL-15 is increased on CD14 monocytes in early stages of MS." J Neuroimmunol **195**(1-2): 135-139.

van Oosten, B. W., M. Lai, S. Hodgkinson, F. Barkhof, D. H. Miller, I. F. Moseley, A. J. Thompson, P. Rudge, A. McDougall, J. G. McLeod, H. J. Ader and C. H. Polman (1997). "Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial." Neurology **49**(2): 351-357.

Vandevyver, C., N. Mertens, P. van den Elsen, R. Medaer, J. Raus and J. Zhang (1995). "Clonal expansion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis: restricted T cell receptor V gene rearrangements and CDR3 sequence." Eur J Immunol **25**(4): 958-968.

Verbist, K. C. and K. D. Klonowski (2012). "Functions of IL-15 in anti-viral immunity: multiplicity and variety." Cytokine **59**(3): 467-478.

Verma, S., S. E. Hiby, Y. W. Loke and A. King (2000). "Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15." Biol Reprod **62**(4): 959-968.

Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H. L. Weiner and D. A. Hafler (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." J Exp Med **199**(7): 971-979.

Vollmer, T. L., D. R. Wynn, M. S. Alam and J. Valdes (2011). "A phase 2, 24-week, randomized, placebo-controlled, double-blind study examining the efficacy and safety of an anti-interleukin-12 and -23 monoclonal antibody in patients with relapsing-remitting or secondary progressive multiple sclerosis." Mult Scler **17**(2): 181-191.

von Andrian, U. H. and C. R. Mackay (2000). "T-cell function and migration. Two sides of the same coin." N Engl J Med **343**(14): 1020-1034.

Waisman, A., J. Hauptmann and T. Regen (2015). "The role of IL-17 in CNS diseases." Acta Neuropathol.

Waldmann, T. (2002). "The contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for the immunotherapy of rheumatological diseases." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S161-167.

Waldmann, T., Y. Tagaya and R. Bamford (1998). "Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors." Int Rev Immunol **16**(3-4): 205-226.

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

Walker, L. S. and A. K. Abbas (2002). "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery." Nat Rev Immunol **2**(1): 11-19.

Wan, Q., L. Kozhaya, A. ElHed, R. Ramesh, T. J. Carlson, I. M. Djuretic, M. S. Sundrud and D. Unutmaz (2011). "Cytokine signals through PI-3 kinase pathway modulate Th17 cytokine production by CCR6+ human memory T cells." J Exp Med **208**(9): 1875-1887.

Wang, H., T. A. Kadlecsek, B. B. Au-Yeung, H. E. Goodfellow, L. Y. Hsu, T. S. Freedman and A. Weiss (2010). "ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a002279.

Wang, R. X., C. R. Yu, I. M. Dambuza, R. M. Mahdi, M. B. Dolinska, Y. V. Sergeev, P. T. Wingfield, S. H. Kim and C. E. Egwuagu (2014). "Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease." Nat Med **20**(6): 633-641.

Waschbisch, A., L. Sammet, S. Schroder, D. H. Lee, A. Barrantes-Freer, C. Stadelmann and R. A. Linker (2014). "Analysis of CD4+ CD8+ double-positive T cells in blood, cerebrospinal fluid and multiple sclerosis lesions." Clin Exp Immunol **177**(2): 404-411.

Weiss, L., A. Roux, S. Garcia, C. Demouchy, N. Haeffner-Cavaillon, M. D. Kazatchkine and M. L. Gougeon (1998). "Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha." J Infect Dis **178**(4): 1158-1162.

Whiteside, T. L. and R. B. Herberman (1989). "The role of natural killer cells in human disease." Clin Immunol Immunopathol **53**(1): 1-23.

Wilkinson, P. C. and F. Y. Liew (1995). "Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15." J Exp Med **181**(3): 1255-1259.

Willenborg, D. O., S. Fordham, C. C. Bernard, W. B. Cowden and I. A. Ramshaw (1996). "IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **157**(8): 3223-3227.

Williams, M. T., Y. Yousafzai, C. Cox, A. Blair, R. Carmody, S. Sai, K. E. Chapman, R. McAndrew, A. Thomas, A. Spence, B. Gibson, G. J. Graham and C. Halsey (2014). "Interleukin-15 enhances cellular proliferation and upregulates CNS homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia." Blood **123**(20): 3116-3127.

Williams, N. K., R. S. Bamert, O. Patel, C. Wang, P. M. Walden, A. F. Wilks, E. Fantino, J. Rossjohn and I. S. Lucet (2009). "Dissecting specificity in the Janus kinases: the structures of JAK-specific inhibitors complexed to the JAK1 and JAK2 protein tyrosine kinase domains." J Mol Biol **387**(1): 219-232.

Wu, C., N. Yosef, T. Thalhammer, C. Zhu, S. Xiao, Y. Kishi, A. Regev and V. K. Kuchroo (2013). "Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1." Nature **496**(7446): 513-517.

Wu, G. F., A. A. Dandekar, L. Pewe and S. Perlman (2000). "CD4 and CD8 T cells have redundant but not identical roles in virus-induced demyelination." J Immunol **165**(4): 2278-2286.

Wu, R., J. H. Zippin and C. Magro (2014). "Double-positive CD4(+)CD8(+) Sezary syndrome: an unusual phenotype with an aggressive clinical course." Cutis **93**(2): E18-25.

Wu, X., W. Pan, Y. He, H. Hsuchou and A. J. Kastin (2010). "Cerebral interleukin-15 shows upregulation and beneficial effects in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **223**(1-2): 65-72.

- Wu, Y., B. Cai, W. Feng, B. Yang, Z. Huang, C. Zuo and L. Wang (2014). "Double positive CD4+CD8+ T cells: key suppressive role in the production of autoantibodies in systemic lupus erythematosus." Indian J Med Res **140**(4): 513-519.
- Xie, D., B. Hai, X. Xie, L. Liu, J. Ayello, X. Ma and J. Zhang (2009). "Peripheral CD4+CD8+ cells are the activated T cells expressed granzyme B (GrB), Foxp3, interleukin 17 (IL-17), at higher levels in Th1/Th2 cytokines." Cell Immunol **259**(2): 157-164.
- Yamaoka, K., P. Saharinen, M. Pesu, V. E. Holt, 3rd, O. Silvennoinen and J. J. O'Shea (2004). "The Janus kinases (Jaks)." Genome Biol **5**(12): 253.
- Yamazaki, T., X. O. Yang, Y. Chung, A. Fukunaga, R. Nurieva, B. Pappu, N. Martin-Orozco, H. S. Kang, L. Ma, A. D. Panopoulos, S. Craig, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian and C. Dong (2008). "CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells." J Immunol **181**(12): 8391-8401.
- Yang, Q., S. R. Goding, M. E. Hokland and P. H. Basse (2006). "Antitumor activity of NK cells." Immunol Res **36**(1-3): 13-25.
- Yates, A. J. (2014). "Theories and quantification of thymic selection." Front Immunol **5**: 13.
- Yeh, T. C., E. Dondi, G. Uze and S. Pellegrini (2000). "A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8991-8996.
- Ylipaasto, P., B. Kutlu, S. Rasilainen, J. Rasschaert, K. Salmela, H. Teerijoki, O. Korsgren, R. Lahesmaa, T. Hovi, D. L. Eizirik, T. Otonkoski and M. Roivainen (2005). "Global profiling of coxsackievirus- and cytokine-induced gene expression in human pancreatic islets." Diabetologia **48**(8): 1510-1522.
- York, N. R., J. P. Mendoza, S. B. Ortega, A. Benagh, A. F. Tyler, M. Firan and N. J. Karandikar (2010). "Immune regulatory CNS-reactive CD8+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Autoimmun **35**(1): 33-44.
- Yu, P., R. N. Bamford and T. A. Waldmann (2014). "IL-15-dependent CD8(+) CD122(+) T cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating IL-17 production by CD4(+) T cells." Eur J Immunol **44**(11): 3330-3341.
- Yu, Q., B. Erman, A. Bhandoola, S. O. Sharrow and A. Singer (2003). "In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells." J Exp Med **197**(4): 475-487.
- Zaguia, F., P. Saikali, S. Ludwin, J. Newcombe, D. Beauseigle, E. McCrea, P. Duquette, A. Prat, J. P. Antel and N. Arbour (2013). "Cytotoxic NKG2C+ CD4 T cells target oligodendrocytes in multiple sclerosis." J Immunol **190**(6): 2510-2518.

Zang, Y. C., S. Li, V. M. Rivera, J. Hong, R. R. Robinson, W. T. Breitbart, J. Killian and J. Z. Zhang (2004). "Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis." J Immunol **172**(8): 5120-5127.

Zanoni, I., R. Spreafico, C. Bodio, M. Di Gioia, C. Cigni, A. Broggi, T. Gorletta, M. Caccia, G. Chirico, L. Sironi, M. Collini, M. P. Colombo, N. Garbi and F. Granucci (2013). "IL-15 cis presentation is required for optimal NK cell activation in lipopolysaccharide-mediated inflammatory conditions." Cell Rep **4**(6): 1235-1249.

Zarogoulidis, P., S. Lampaki, L. Yarmus, I. Kioumis, G. Pitsiou, N. Katsikogiannis, W. Hohenforst-Schmidt, Q. Li, H. Huang, A. Sakkas, J. Organtzis, L. Sakkas, I. Mpoukovinas, K. Tsakiridis, G. Lazaridis, K. Syrigos and K. Zarogoulidis (2014). "Interleukin-7 and interleukin-15 for cancer." J Cancer **5**(9): 765-773.

Zhang, J., A. Lapato, S. Bodhankar, A. A. Vandembark and H. Offner (2015). "Treatment with IL-10 producing B cells in combination with E2 ameliorates EAE severity and decreases CNS inflammation in B cell-deficient mice." Metab Brain Dis.

Zhang, J., S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus, H. L. Weiner and D. A. Hafler (1994). "Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis." J Exp Med **179**(3): 973-984.

Zhang, T., X. Bai and X. Mao (2013). "Systemic delivery of small interfering RNA targeting the interleukin-2/15 receptor beta chain prevents disease progression in experimental arthritis." PLoS One **8**(11): e78619.

Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough and J. Sprent (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15." Immunity **8**(5): 591-599.

Zhong, M., M. A. Henriksen, K. Takeuchi, O. Schaefer, B. Liu, J. ten Hoeve, Z. Ren, X. Mao, X. Chen, K. Shuai and J. E. Darnell, Jr. (2005). "Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 3966-3971.

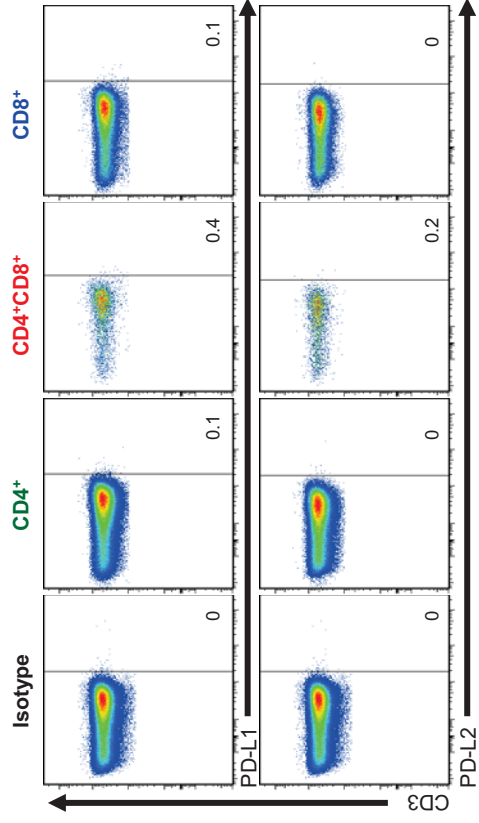
Ziolkowska, M., A. Koc, G. Luszczkiewicz, K. Ksiezopolska-Pietrzak, E. Klimczak, H. Chwalinska-Sadowska and W. Maslinski (2000). "High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism." J Immunol **164**(5): 2832-2838.

Zloza, A. and L. Al-Harhi (2006). "Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration." J Leukoc Biol **79**(1): 4-6.

Zloza, A., Y. B. Sullivan, E. Connick, A. L. Landay and L. Al-Harhi (2003). "CD8⁺ T cells that express CD4 on their surface (CD4^{dim}CD8^{bright} T cells) recognize an antigen-specific

target, are detected in vivo, and can be productively infected by T-tropic HIV." Blood **102**(6): 2156-2164.

Figure supplémentaire



Ctrl n=2

Figure 23: Expression *ex-vivo* de PD-L1 et PD-L2 par différentes sous-populations de lymphocytes T humains. Des PBMCs ont été marqués pour les molécules suivantes: CD14, CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD56, PD1, PD-L1 ou PD-L2 puis, analysés par cytométrie pour les populations CD4, CD4CD8 et CD8. Les proportions de lymphocytes T CD4, CD8 et CD4CD8 exprimant PD-L1 ou PD-L2 ont été déterminées chez deux donneurs sains. Les résultats obtenus pour un donneur sain sont illustrés. Les analyses sont basées sur les signaux obtenus des témoins isotypiques à partir des cellules CD3 positives.

Tableau V: Récapitulatif des analyses statistique de la cinétique d'IL-2 pour les DP vs. toutes les autres populations lymphocytaire

Temps	CD4CD45RA	CD4CD45RO	CD8CD45RA	CD8CD45RO
0	ns	ns	ns	ns
5	**	ns	**	ns
10	***	ns	***	ns
15	***	ns	***	*
30	***	ns	***	*
60	***	ns	**	ns
90	***	ns	***	ns

Tableau VI: Récapitulatif des analyses statistique de la cinétique d'IL-15 pour les DP vs. toutes les autres populations lymphocytaire

Temps	CD4CD45RA	CD4CD45RO	CD8CD45RA	CD8CD45RO
0	Ns	ns	*	*
5	***	**	***	***
10	***	**	***	***
15	***	**	***	***
30	***	**	***	***
60	***	***	***	***
90	***	*	***	***

Tableau VII: Récapitulatif des analyses statistiques de la dose-réponse d'IL-2 pour les DP vs. toutes les autres populations lymphocytaires

U/ml	CD4CD45RA	CD4CD45RO	CD8CD45RA	CD8CD45RO
Nil	**	**	ns	**
10	**	ns	**	***
50	***	ns	***	***
200	***	ns	***	***
500	***	ns	***	**
1000	***	ns	**	*

Tableau VIII: Récapitulatif des analyses statistiques de la dose-réponse d'IL-15 pour les DP vs. toutes les autres populations lymphocytaires

ng/ml	CD4CD45RA	CD4CD45RO	CD8CD45RA	CD8CD45RO
Nil	ns	ns	ns	ns
0.2	ns	ns	ns	ns
0.5	*	ns	ns	ns
1	***	ns	ns	ns
2.5	***	ns	*	ns
5	***	ns	**	ns