

Université de Montréal

Impact de l'IL-15 dans un modèle murin de la sclérose en plaques

par Gabrielle Deblois

Département de Neurosciences, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de M.Sc

en Neurosciences

Avril, 2017

© Gabrielle Deblois, 2017

Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie chronique inflammatoire du système nerveux central (SNC). Elle est caractérisée par des lésions de démyélinisation et des infiltrations de cellules immunitaires dans le SNC. Notre laboratoire a identifié l'interleukine 15 (IL-15), une cytokine pro-inflammatoire, comme un effecteur potentiel de la SEP. Nous avons montré que cette cytokine est exprimée à des niveaux plus élevés dans le sang et dans les lésions de patients atteints de la SEP. Les mécanismes par lesquels l'IL-15 participe à la pathogenèse de la SEP sont encore mal connus. Le but de ce projet, était de déterminer l'effet d'une élévation périphérique d'IL-15 sur le développement d'un modèle animal de la SEP, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Nous avons aussi déterminé le phénotype des cellules immunes qui peuvent répondre à l'IL-15. Nous avons injecté l'IL-15 pendant 8 jours à des souris EAE et avons suivi leur score clinique. Le SNC et la rate ont été récupérés pour les analyses de cytométrie. Nos résultats montrent que les injections d'IL-15 en périphérie augmentaient la sévérité de l'EAE et la fréquence des lymphocytes T CD8 et des cellules NK en périphérie. Les injections d'IL-15 ont eu tendance à augmenter la fréquence des cellules NK ayant infiltré le SNC. Ces cellules ont aussi démontré une tendance à exprimer une chaîne clé du récepteur à l'IL-15 en plus grande quantité. Nos travaux ont démontré qu'une élévation de la concentrations d'IL-15 en périphérie augmentent la sévérité de l'EAE et altèrent les propriétés des cellules immunitaires en périphérie et dans le SNC.

Mots-clés : Sclérose en plaques, EAE, interleukine 15, Neuroinflammation, Infiltrations cellulaires, Système nerveux central, Lymphocyte T CD8, Cellule NK

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory disease of the central nervous system (CNS). This disease is characterized by demyelination and immune cell infiltration in the CNS. Studies have shown that the immune system plays a key role in MS pathogenesis. Our laboratory identified the cytokine, interleukin 15 (IL-15), as a potential effector in MS development. IL-15 has been shown to be elevated in the blood and lesions of MS patients; however, its implications or its mechanisms of action in MS are not well defined. The goal of this project was to assess the role of IL-15 in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal model of MS. In this project, we injected peripheral IL-15 for 8 days to EAE mice and followed their clinical score. We also harvested the CNS and the spleen for cytometry analysis. Our results showed that peripheral injection of IL-15 caused a more severe EAE, and changed the frequency of CD8 T lymphocytes and NK cells in the periphery and CNS. We also showed that CD8 T cells in the periphery and CNS have increased IL-15 receptor expression after the IL-15 injection. Overall, our data show that peripheral IL-15 plays a role in the progression of EAE and affects the phenotype and number of immune cells.

Keywords : multiple sclerosis, EAE, interleukine 15, CD8 T cells, NK cells. Immune cell infiltration, NK cells

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Introduction.....	1
Le système immunitaire.....	2
Système immunitaire inné.....	2
Système immunitaire adaptatif.....	4
La sclérose en plaques.....	13
Médicaments modificateurs de l'évolution de la SEP.....	18
Le modèle EAE.....	20
Les cytokines.....	23
L'interleukine 15 (IL-15).....	24
Biologie et structure de l'IL-15.....	24
Régulation de l'expression IL-15 : transcription, traduction, trafic intracellulaire.....	25
Le récepteur à l'IL-15.....	26
Mécanisme de présentation/sécrétion de l'IL-15.....	27
Voies de signalisation associées à l'IL-15.....	28
Rôle, Fonction et expression de l'IL-15.....	29
Rôle de l'IL-15 dans les maladies.....	31
Modèles de souris déficientes en transgéniques en IL-15/IL-15R α	36
Hypothèse et buts.....	38
Matériel et Méthodes.....	39
Induction de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).....	40
Expression d'IL-15 par PCR quantitatif.....	42

Extraction d'ARN de tissus de souris	42
Isolement des cellules d'organes de souris	44
Cytométrie en flux et détection des chaînes du récepteur à l'IL-15	45
Injection du complexe IL-15/IL-15R α aux souris atteintes de l'EAE	48
Effet de l'IL-15 sur la détection de CD122 sur splénocytes in vitro	48
Analyses statistiques	49
Résultats	50
L'ARN messager de l'IL — 15 est surexprimé au pic de la maladie EAE dans le SNC .	51
Les injections d'IL-15 provoquent une EAE plus sévère	53
Les injections d'IL-15 semblent avoir un effet sur les populations de cellules immunitaires infiltrant le SNC	57
Les injections d'IL-15 n'affectent pas les populations cellulaires susceptibles de répondre à cette cytokine dans le SNC	60
Les injections d'IL-15 diminuent les fréquences des lymphocytes T CD4 effectrices précoces (EEC) parmi les leucocytes qui infiltrent le SNC	63
L'augmentation de l'IL-15 n'a pas d'effet sur le phénotype de lymphocytes T CD8 qui infiltrent le SNC	65
Les souris injectées à l'IL-15 ont plus de lymphocytes T CD8 et de cellules NK en périphérie	68
Les souris injectées à l'IL-15 ont plus de cellules susceptibles de répondre à l'IL-15 que les groupes contrôles	72
Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des lymphocytes T CD4 en périphérie	75
Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des lymphocytes T CD8 en périphérie	75
Les injections d'IL-15 n'affectent pas la sécrétion de cytokines en périphérie	78
Discussion	82
Expression de l'IL-15 dans l'EAE	84
Les injections d'IL-15 affectent la pathogenèse de l'EAE	85
L'effet des injections d'IL-15/IL-15R α sur les populations cellulaires	89

Les populations cellulaires qui infiltrent le SNC en réponse à l'IL-15	90
Les cellules susceptibles de répondre aux injections d'IL-15 (les CD122+).....	91
Phénotype mémoire/effecteur des populations cellulaires après les injections d'IL-15 complexée	94
Expression des cytokines en périphérie après injection d'IL-15	95
Conclusion :	100
Bibliographie :	103

Liste des tableaux

Tableau I.	Échelle de score clinique des souris EAEScore.....	41
Tableau II.	Mix d'anticorps utilisés en cytométrie en flux sur cellules de souris extraites d'organes	46

Liste des figures

Figure 1.	La transprésentation de l'interleukine 15.....	28
Figure 2.	schéma du protocole d'expérimentation.....	41
Figure 3.	L'ARNm codant pour l'IL-15 est surexprimé dans la moelle épinière au pic de l'EAE	52
Figure 4.	L'injection du complexe IL-15/IL15R α après le début des symptômes augmente la sévérité de l'EAE	56
Figure 5.	Stratégie d'analyse de cytométrie pour le SNC	58
Figure 6.	Les souris injectées à l'IL-15 tendent à avoir plus de Cellule NK dans le SNC ..	59
Figure 7.	Les injections d'IL-15 n'affectent pas les populations de cellules immunitaires positives pour le récepteur CD122 dans le SNC.....	62
Figure 8.	Les injections d'IL-15 diminuent la proportion de cellules effectrices précoces (EEC) chez les cellules T CD4 infiltrant le SNC.....	64
Figure 9.	Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des cellules T CD8 infiltrant le SNC.....	67
Figure 10.	Stratégie d'analyse de cytométrie pour la rate.....	70
Figure 11.	Les souris injectées à l'IL-15 ont plus de cellules T CD8 et de cellules NK en périphérie	71
Figure 12.	Les souris injectées à l'IL-15 possèdent plus de cellules NK positives pour le récepteur CD122 et des niveaux plus élevés de CD122 sur les cellules T CD8.....	74
Figure 13.	Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des lymphocytes T CD4 en périphérie.....	76
Figure 14.	Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des lymphocytes T CD8 en périphérie.....	77
Figure 15.	Stratégie d'analyse de cytométrie pour l'expression de cytokines en périphérie .	80
Figure 16.	Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur la sécrétion de cytokines en périphérie	81
Figure 17 :	Représentation génétique de la cassette insérée dans le gène de l'IL-15 de la souris déficiente en IL-15	89
Figure 18.	Figure récapitulative	102

Liste des sigles et abréviations

A488 : Alexa Fluor 488®

A700 : Alexa Fluor 700®

BV : *brilliant violet*

ARNm : Acide ribonucélique messenger

Bcl-2 : *bcell lymphoma*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

cDNA : ADN complémentaire

CSF : liquide cébrospinal

DPEC : cellule effectrice double positive (*double positive effector cell*)

EEC : cellule effectrice précoce (*early effector cell*)

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

GM-CSF : facteur stimulant de colonie de granulocytes et de macrophages

HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransférase

IL-15 R α : récepteur alpha de l'interleukine 15

IL-2R β : récepteur beta de l'interleukine 2

IL : interleukine

IFN γ / β : interféron gamma/beta

JAK : *Janus associated Kinase*

LPS : lipopolysaccharide

MOG : glycoprotéine de la myéline des oligodendrocytes

MPEC : précurseur de cellules mémoire (*memory precursor cell*)

NK: *natural killer*

PB: Pacific blue

PI3K : *phospho inositol Kinase*

Percp cy5.5: peridinin-chlorophyl protein Cy5.5

PE: phycoerythrin

PE C7: phycoerithrin Cy7

PCR: réaction de polymérase en chaîne

Ras/MAPK : *mitogen activated protein kinase*

SEP : Sclérose en Plaques

SLEC : cellule effectrice de courte longévité (*short live effector cell*)

SNC : système nerveux central

STAT *signal transducer and activator of transcript*

Tc : Lymphocyte T cytotoxique

TCR : récepteur des lymphocytes T

Th : Lymphocyte T *helper*

TNF : *Tumor necrosis factor*

Treg : Lymphocyte T régulateur

γ c : Chaîne commune gamma

Introduction

Le système immunitaire

Le système immunitaire est une organisation de cellules et de molécules ayant pour but de protéger l'hôte d'une éventuelle infection et de prévenir la croissance de cellules anormales pouvant se développer en tumeurs. Il se divise en deux regroupements ; le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

Système immunitaire inné

Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense de l'organisme et est composé de barrières physiques et chimiques, de protéines et de cellules. Les barrières telles l'épithélium de la peau et de muqueuses ont pour rôle de prévenir l'entrée de pathogènes. Le système inné englobe aussi des protéines pouvant agir rapidement afin de combattre les pathogènes. Par exemple, la cascade du complément comprend des protéines qui, en présence d'un pathogène, s'activent pour produire des enzymes lytiques qui permettront d'éliminer ce pathogène et des molécules chimio-attractives pour appeler en renfort des leucocytes. Le répertoire cellulaire du système immunitaire inné est constitué de cellules phagocytaires (e.g. macrophages, monocytes, cellules dendritiques, neutrophiles) qui produisent des médiateurs inflammatoires, et des cellules NK (décrites plus loin).

Parmi les cellules du système immunitaire inné, les cellules présentatrices d'antigènes (e.g. cellules dendritiques) jouent un rôle important pour déclencher les réponses immunitaires du système adaptatif (Delves and Roitt 2000). Les cellules présentatrices d'antigène reconnaissent des structures partagées par des micro-organismes (appelées patrons moléculaires associés à des pathogènes) ou des structures associées à des molécules de danger via des récepteurs de reconnaissance de pathogènes tels les récepteurs Toll-like. Les lipopolysaccharides, les protéines *heat-shock*, les déchets de tissus nécrotiques, représentent des exemples de molécules qui peuvent se lier à de tels récepteurs et enclencher l'activation de cellules présentatrices d'antigène. De plus, les cellules présentatrices phagocytent des particules de leur environnement, dont des pathogènes et leurs protéines. Les polypeptides ingérés sont apprêtés afin d'être présentés via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux lymphocytes T (Delves and Roitt 2000). Suite à la reconnaissance des patrons de pathogènes ou de danger et l'activation subséquente des cellules présentatrices d'antigène, celles-ci expriment

des molécules de costimulation (e.g. CD80 et CD86) et migrent aux nœuds lymphatiques afin de présenter le complexe peptide antigénique-CMH aux lymphocytes T (Delves and Roitt 2000).

Cellules NK

Les cellules NK sont des cellules effectrices du système immunitaire inné et jouent un rôle important dans l'immunosurveillance. Ces cellules ne requièrent pas de préactivation ou sensibilisation avant de déployer leurs armes pour éliminer des cellules cancéreuses d'où leur nom « *natural killer* » (Kwon, Kim et al. 2017). Leur découverte s'est faite dans un modèle in vitro par leur capacité à détruire les tumeurs (Cerwenka and Lanier 2001). En plus de prévenir le développement de certaines tumeurs (Cerwenka and Lanier 2001), elles participent au contrôle de certaines infections virales (e.g. virus de l'herpès, cytomégalovirus humain, etc.). Les cellules NK représentent environ 15 % des lymphocytes de la périphérie (Cerwenka and Lanier 2001). Ces cellules se retrouvent aussi dans les tissus comme le foie, la cavité péritonéale et le placenta (Cerwenka and Lanier 2001) et au sein d'autres tissus lors de l'inflammation (Parisi, Bassani et al. 2017). Le développement des cellules NK est dépendant de la présence de certaines cytokines comme l'interleukine 15 (IL-15) (Elpek, Rubinstein et al. 2010).

Les cellules NK sont régulées par une balance entre les signaux transmis par des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs présents ou absents sur des cellules infectées ou présentant des anomalies. Les récepteurs activateurs incluent entre autres le NKG2D, la famille de récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR : NKp30, NKp46 et NKp44) et la molécule accessoire DNAX 1 (DNAM-1). Ces récepteurs activateurs reconnaissent des molécules dont l'expression est induite par un stress cellulaire, une infection ou la transformation tumorale (Kwon, Kim et al. 2017). Les récepteurs inhibiteurs incluent les « *killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR)* » chez l'humain ou Ly49 chez la souris ; ces récepteurs reconnaissent la présence de molécules de CMH de classe I (Elpek, Rubinstein et al. 2010). Les cellules NK contribuent de façon substantielle à contrer certaines infections virales. Certains virus (e.g. cytomégalovirus humain) déclenchent des mécanismes menant à la diminution ou l'abolition de l'expression des molécules du CMH de classe I par les cellules qu'ils ont infectées afin d'évader la reconnaissance par les lymphocytes T CD8 (Cerwenka and Lanier 2001). Toutefois, la présence des molécules du CMH agit comme signal inhibiteur pour les cellules NK ; ainsi

lorsque les cellules infectées perdent une telle expression, celles-ci deviennent susceptibles aux attaques par des cellules NK (Cerwenka and Lanier 2001).

Plusieurs stimuli activateurs peuvent augmenter l'expression de molécules lytiques telles le granzyme B et la perforine (Parisi, Bassani et al. 2017) et la production de cytokines effectrices telles que l'interféron gamma I (IFN γ), le *tumor necrosis factor* (TNF) et le *granulocyte and macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) par les cellules NK (Cerwenka and Lanier 2001, Parisi, Bassani et al. 2017).

Système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif prend 7-10 jours après l'infection initiale afin de se déployer efficacement. Le but de ce système est d'élaborer une réponse immune spécifique au pathogène rencontré lors de la primo-infection et une réponse immune mémoire pour combattre cette infection avec une efficacité et une rapidité accrues lors des expositions subséquentes au même pathogène. Les lymphocytes T et B et leurs molécules effectrices (e.g. anticorps) constituent les éléments clés du système immunitaire adaptatif (Delves and Roitt 2000). L'activation d'un lymphocyte B se produit lorsque celui-ci reconnaît un antigène via son récepteur spécifique composé d'une immunoglobuline de surface (Delves and Roitt 2000) ; cette activation est plus efficace en présence de molécules d'activation (e.g. CD40L, cytokines) fournies par d'autres leucocytes (e.g. lymphocytes T folliculaires). Le lymphocyte B ainsi activé peut acquérir de nouvelles propriétés telles que la production de cytokines et se différencier en cellule productrice d'anticorps. Les anticorps sécrétés peuvent reconnaître des antigènes du pathogène et ainsi participer aux mécanismes de contrôle de l'infection (Delves and Roitt 2000).

Tel que mentionné à la page 1, la cellule présentatrice d'antigène (e.g. cellule dendritique) activée par la présence du pathogène et ayant phagocyté des particules ou fragments de ce pathogène migre vers le nœud lymphatique afin d'activer les lymphocytes T (Delves and Roitt 2000).

Les lymphocytes T

Les lymphocytes T ont, à leur surface, un récepteur appelé le récepteur de lymphocyte T (TCR) qui reconnaît le complexe antigène/CMH à la surface de cellules présentatrices d'antigène. Le TCR est formé d'un hétérodimère des chaînes α et β ou γ et δ (Delves and Roitt 2000). Le TCR

possède un grand répertoire pour la reconnaissance de l'antigène grâce à la recombinaison des segments V, D, J sur les chromosomes (Delves and Roitt 2000).

Développement des lymphocytes T au thymus

Les progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse migrent dans le thymus pour terminer leur différenciation et générer les lymphocytes T CD4 et CD8 fonctionnels du système immunitaire (Starr, Jameson et al. 2003, Labrecque, Baldwin et al. 2011). De nombreuses étapes sont essentielles à la maturation finale des thymocytes en lymphocytes T matures; plusieurs signaux clés sont fournis par des cellules épithéliales thymiques et des fibroblastes mésenchymaux (Starr, Jameson et al. 2003). Les cellules épithéliales thymiques forment une structure tridimensionnelle qui favorise les interactions étroites avec les lymphocytes T doubles négatifs et double positif. Une cellule épithéliale peut former des interactions avec au moins 20 lymphocytes à elle seule (Klein, Kyewski et al. 2014).

Tout d'abord, les progéniteurs se différencient en thymocytes doubles négatifs (CD4-CD8-) tout en préservant leur capacité proliférative. Les cellules doubles négatives migrent dans la région cortico-médullaire du thymus avant de migrer vers l'épithélium subcapsulaire au cours de leur passages à travers les stades 1 à 4 de leur différenciation (Starr, Jameson et al. 2003). Ces quatre stades sont caractérisés par une expression distincte des molécules CD44, CD25 et CD117 (aussi appelé c-kit). Au stade 1, les cellules doubles négatives ont le phénotype suivant : CD44+CD25-CD117^{hi}, puis au stade 2 CD44-CD25+CD117^{hi/inter}, au stade 3 : CD44^{lo}CD25+CD117^{lo} et finalement au stade 4 : CD44-CD25-CD117^{lo} (Starr, Jameson et al. 2003, Labrecque, Baldwin et al. 2011). C'est au stade 3 que le réarrangement de la chaîne β du TCR a lieu (Starr, Jameson et al. 2003, Labrecque, Baldwin et al. 2011). Le réarrangement de la chaîne β est le produit de la juxtaposition de différents segments d'ADN nommés : V (variable), D (diversité) et J (juxtaposant) grâce à l'activité des enzymes *recombination activating gene* (RAG); les nombreux segments de chaque groupe (V, D, J) permettent de donner naissance à un immense répertoire de TCR. Les cellules qui n'arrivent pas à réussir le réarrangement de la chaîne TCR β ne peuvent pas exprimer le Pré-TCR (composé du TCR β , du Pré-T α et du CD3) et meurent par apoptose (Labrecque, Baldwin et al. 2011). Le Pré-TCR assure la survie des cellules qui peuvent passer au stade 4 des doubles négatives et ainsi compléter l'étape de β -sélection. Les cellules

prolifèrent et deviennent doubles positives CD4+CD8+; ceux-ci réarrangent la chaîne α de leur TCR (TCR α). Ce réarrangement est le produit de la juxtaposition d'un segment d'ADN V et J. Après le réarrangement réussi du TCR α , les thymocytes doubles positifs expriment de bas niveaux du TCR $\alpha\beta$ (Labrecque, Baldwin et al. 2011).

Les cellules doubles positives TCR $\alpha\beta^{\text{lo-inter}}$ entrent ensuite dans des processus de la sélection positive. Cette étape permet de favoriser la survie des thymocytes qui expriment un TCR pouvant reconnaître les molécules du CMH autologues. Les thymocytes qui expriment un TCR $\alpha\beta$ ayant une faible affinité pour les complexes CMH-peptide du soi présentés survivent et continuent le processus de maturation. Si le premier réarrangement de la chaîne α n'a pas permis la formation d'un TCR adéquat pour la reconnaissance de complexes CMH-peptide, la cellule tente de former un TCR adéquat par le réarrangement du locus TCR α . Si le thymocyte ne peut générer un TCR $\alpha\beta$ pouvant reconnaître des complexes CMH-peptides, il meurt. Les thymocytes ayant survécu à la sélection positive augmentent les niveaux d'expression de leur TCR et deviennent simple positif soit CD4+CD8- ou CD4-CD8+ selon la reconnaissance par leur TCR d'un CMH de classe II ou de classe I respectivement.

Les thymocytes doivent subir l'étape de la sélection négative qui a pour but d'éliminer les cellules qui expriment un TCR démontrant une trop grande affinité pour les peptides du soi. La sélection négative peut se produire au stade double positif (CD4+CD8+) et simple positif (CD4+CD8- ou CD4-CD8+) (Labrecque, Baldwin et al. 2011). Les thymocytes simples positifs interagissent avec plusieurs cellules présentatrices d'antigènes au sein de la médulla du thymus afin d'interagir avec les complexes CMH présentant des antigènes du soi. Les thymocytes ayant une trop grande affinité pour de tels complexes sont éliminés. De nombreux mécanismes contrôlent l'expression de protéines du soi qui peuvent être présentés par les molécules du CMH au sein du thymus. Cette étape de sélection négative permet d'éliminer de nombreuses mais pas toutes les cellules porteuses de TCR reconnaissant des antigènes du soi car certains antigènes ne sont pas exprimés dans le thymus. Les cellules qui passent l'étape de sélection positive continuent leur différenciation en cellule simple positive pour le corécepteur CD4 ou CD8

(Labrecque, Baldwin et al. 2011) pour finalement quitter le thymus en tant que lymphocytes T CD4 ou CD8 matures.

Les lymphocytes T CD4 et CD8

Les lymphocytes T CD4⁺, aussi appelés lymphocytes T auxiliaires (Thelper), expriment la molécule CD4 qui stabilise l'interaction du TCR avec une molécule du CMH de classe II (Delves and Roitt 2000). Les lymphocytes T CD8, aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques (Tc) reconnaissent le CMH de classe I. Les molécules du CMH de classe I peuvent être exprimées par toutes les cellules nucléées. Ceci permet aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques de potentiellement reconnaître toutes les cellules susceptibles d'être infectées (Delves and Roitt 2000). Les molécules du CMH de classe II sont présentes principalement sur les cellules présentatrices d'antigènes spécialisées (e.g. cellules dendritiques, lymphocytes B et macrophages) et l'interaction avec les lymphocytes T CD4 induit la production de cytokines (Delves and Roitt 2000).

Le complexe TCR/CD3

La présentation de l'antigène se fait à l'aide d'un complexe comprenant l'antigène de surface CD3 et ses différentes chaînes (γ , δ , ϵ , ζ) (Clevers, Alarcon et al. 1988). L'antigène de surface CD3 est commun à tous les lymphocytes T. Un lymphocyte T a besoin que le complexe TCR/CD3 soit assemblé correctement pour permettre ces fonctions (Clevers, Alarcon et al. 1988). Le complexe est d'abord assemblé dans le cytoplasme puis transporté à la surface cellulaire. Les lymphocytes T ayant une délétion d'une des chaînes de TCR ou du CD3 ne peuvent pas transporter le complexe à la membrane cellulaire (Clevers, Alarcon et al. 1988). Dans la maturation des lymphocytes T au thymus, les gènes qui codent pour le complexe TCR/CD3 sont exprimés dans la phase finale de maturation. Ces deux molécules ont des domaines transmembranaires avec des queues cytoplasmiques qui, lorsque l'antigène est reconnu, enclenchent une série de voies de signalisation menant à l'activation du lymphocyte T (Clevers, Alarcon et al. 1988). Les co — récepteurs CD4 et CD8 ont pour effet d'augmenter l'interaction du TCR avec le CMH correspondant et de stabiliser cette interaction (Luescher, Vivier et al. 1995, Hampl, Chien et al. 1997).

Activation des lymphocytes T

L'interaction d'un TCR avec un complexe CMH/peptide n'est pas suffisante pour activer un lymphocyte T. L'activation des lymphocytes T s'effectue lorsque ceux-ci sont simultanément exposés à 3 signaux importants (Pollard, De Koker et al. 2013). Le premier signal est l'interaction du complexe TCR avec le complexe peptide/CMH (I ou II) (Gutcher and Becher 2007, Pollard, De Koker et al. 2013). Le deuxième signal est l'interaction de la molécule CD28 du lymphocyte T avec la molécule CD80/CD86 (ou B7) de la cellule présentatrice d'antigène (Gutcher and Becher 2007, Pollard, De Koker et al. 2013). Le troisième signal est la production de cytokine comme l'IL-2 qui favorise l'activation, la prolifération et la différenciation en cellules effectrices des lymphocytes T (Gutcher and Becher 2007, Pollard, De Koker et al. 2013). Les lymphocytes T activés produisent aussi le l'IL-2 de manière autocrine qui induit leur expansion clonale (Abbas 2003). C'est le troisième signal qui dirige la polarisation cellulaire des lymphocytes T (Gutcher and Becher 2007). Dans les années 1980, deux types de lymphocytes T CD4 ont été décrits ayant des rôles effecteurs différents (Gutcher and Becher 2007). Les lymphocytes T CD4 avaient été divisés en Th1 et Th2 basés sur leur production de cytokines (Gutcher and Becher 2007). Plus tard, les cellules de type Th17 ainsi que d'autres types de lymphocytes T ont été décrits (Gutcher and Becher 2007).

Les lymphocytes T et leurs différentes réponses (Th1, Th2, Th17)

Durant l'activation et la différenciation du stade naïf au stade effecteur, les lymphocytes T modifient leurs propriétés selon les signaux reçus, particulièrement des cytokines produites par les cellules présentatrices d'antigène. Les lymphocytes T se polarisent en sous-type spécifique afin d'acquérir les mécanismes d'action qui sont les plus appropriés pour combattre le type d'infection en cours. La polarisation des lymphocytes T dicte l'expression de facteurs de transcription, des récepteurs de chimiokines et la production de cytokines spécifiques (Kidd 2003). De nombreux travaux ont démontré que les signaux favorisant une voie de polarisation ont aussi la possibilité d'inhiber la polarisation vers d'autres sous-types cellulaires (Kidd 2003). Les signaux polarisants et les caractéristiques des lymphocytes T CD4 ont été davantage étudiés que ceux des lymphocytes T CD8. Néanmoins, il est possible de présenter les sous-types de polarisation de lymphocytes T comme étant les lymphocytes Th1/Tc1, Th2/Tc2, et Th17/Tc17 (Kidd 2003).

Th1

La polarisation des lymphocytes T vers un phénotype Th1/Tc1 est favorisée lors de l'activation en présence de l'IL-12 et l'IFN γ (Kidd 2003, Dos Passos, Sato et al. 2016). L'IFN γ peut provenir des cellules NK du système immunitaire inné alors que la production d'IL-12 par des cellules dendritiques est fortement induite en réponse à des ligands de TLR (Ivanova and Orekhov 2015). Les cellules Th1/Tc1 expriment le récepteur de transcription T-bet et ont leur capacité de produire les cytokines IFN γ , TNF et IL-2 (Kidd 2003, Ivanova and Orekhov 2015, Dos Passos, Sato et al. 2016). La production d'IFN γ par les cellules Th1 provoque une boucle de rétroaction positive à la polarisation des cellules. Les lymphocytes Th1/Tc1 jouent un rôle crucial dans le contrôle d'infections virales et bactériennes intracellulaires (Kidd 2003). Ces lymphocytes ont aussi été impliqués dans des réponses inflammatoires délétères et chroniques dans de nombreuses maladies (ex. sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde, diabète de type I) (Kidd 2003, Ivanova and Orekhov 2015).

Th2

La réponse Th2/Tc2 quant à elle, est induite en réponse à la cytokine IL-4 (Kidd 2003, Ivanova and Orekhov 2015). Les cellules Th2 expriment le facteur de transcription GATA3 et produisent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. Les cellules Th2 favorisent la réponse humorale (production d'anticorps) du système immunitaire adaptatif. Ces réponses immunitaires jouent un rôle essentiel dans le contrôle d'infection extracellulaire ou de parasite (Ivanova and Orekhov 2015). Les cellules Th2 et leurs médiateurs ont été impliqués dans le développement des allergies (Ivanova and Orekhov 2015).

Th17

Les cellules T se polarisent en Th17 lorsque l'activation s'effectue en présence d'IL-6, d'IL-21, et de TGF- β . L'IL-23 est important dans la survie et le maintien des cellules polarisées en Th17 (Ivanova and Orekhov 2015). Les lymphocytes Th17 expriment le facteur de transcription ROR γ t et elles produisent les cytokines : IL-17A, IL-17F (Ivanova and Orekhov 2015) et IL-22. Elles peuvent aussi sécréter l'IL-21, l'IL-22 et le GM-CSF. En situation normale, les cellules Th17 sont présentes dans l'intestin et confèrent une protection contre certains pathogènes (Ivanov, Atarashi et al. 2009, Ivanova and Orekhov 2015) et aussi dans le maintien

des propriétés de barrière dans l'intestin en réponse à des bactéries commensales (ex. bactérie filamenteuse segmentée *Arthromitus*) (Ivanov, Atarashi et al. 2009) (Schnupf, Gaboriau-Routhiau et al. 2015). Ces cellules sont efficaces contre les infections bactériennes et fongiques telles que les infections à *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans* (Curtis and Way 2009). Les cellules Th17 jouent un rôle important dans les maladies chroniques inflammatoires comme la sclérose en plaques (SEP) (Dos Passos, Sato et al. 2016).

Les lymphocytes Th1/Th17 et leur contribution aux pathologies inflammatoires chroniques :

Les cellules Th1 et Th17 ont été identifiées comme pathogéniques dans plusieurs maladies chroniques inflammatoires incluant la SEP, la maladie de Crohn et la polyarthrite rhumatoïde. Le rôle des cellules Th1/Th17 a été étudié dans des modèles animaux (Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), uvéite) (Damsker, Hansen et al. 2010). Les premières études effectuées sur les modèles de maladies inflammatoires (e.g. EAE) ont démontré le rôle des lymphocytes T CD4 autoréactifs producteurs d'IFN γ (Damsker, Hansen et al. 2010). Par contre, les souris déficientes en IFN γ développent quand même la maladie. Les lymphocytes T CD4 producteurs d'IL-17 ont été identifiés comme potentiellement pathogènes (Damsker, Hansen et al. 2010). Les cellules polarisées en Th1 et Th17 semblent se réguler l'une et l'autre comme le font les cellules Th1/Th2. La délétion d'une des cytokines spécifiques à chacune de ces réponses favorise la réponse de l'autre dans certains modèles. Par exemple les modèles animaux déficients en IFN γ , induits avec de l'adjuvant complet de Freund, montrent une augmentation de la réponse Th17 (Damsker, Hansen et al. 2010). Lors de l'induction du modèle de l'uvéite chez des souris déficientes pour l'IL-17, la réponse Th1 est augmentée ; les souris ont davantage de lymphocytes T CD4 qui expriment l'IFN γ . Puis, dans le début de l'EAE, les cellules Th1 productrices d'IFN γ régulent négativement la réponse Th17 (Damsker, Hansen et al. 2010). L'induction des maladies par ces deux réponses diffère dans le recrutement et la localisation des cellules au site inflammatoires. Dans le modèle de l'uvéite, le transfert adoptif de cellules Th1 cause une infiltration de leucocytes mononucléés dans l'œil des souris tandis que le transfert de cellules Th17 cause une infiltration de neutrophiles (Damsker, Hansen et al. 2010). La même chose est observée pour les transferts adoptifs dans le modèle EAE. Le transfert de cellules Th1 cause une infiltration massive de macrophages dans le SNC tandis que le transfert de

cellules Th17 cause une infiltration de neutrophiles (Damsker, Hansen et al. 2010). Ces deux types de cellules sont présents au site inflammatoire, mais elles semblent dépendantes l'une de l'autre pour leur recrutement au site inflammatoire. Dans le modèle EAE, les cellules Th1 entrent en premier dans le SNC puis les cellules Th17 sont recrutées en second lieu (Damsker, Hansen et al. 2010). Cependant dans d'autres modèles, l'inverse est observé.

Les réponses Th1/Th17 montrent une plasticité; des lymphocytes T peuvent produire simultanément de l'IFN γ et de l'IL-17 dans le SNC et les yeux (Shi, Cox et al. 2008, Damsker, Hansen et al. 2010). Des études ont montré que les cellules Th17 en présence d'un environnement favorisant la réponse Th1 changent de phénotype in vitro et in vivo; toutefois, l'inverse n'a pas été observé suggérant que le phénotype Th1 démontre une moins grande plasticité que le phénotype Th17 (Shi, Cox et al. 2008, Damsker, Hansen et al. 2010).

La différenciation des lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8 sont activés lors de l'interaction avec une cellule présentatrice d'antigène dans un organe lymphoïde secondaire (Obar, Jellison et al. 2011). Cette activation permet aux lymphocytes T CD8 d'acquérir un phénotype cytotoxique ou mémoire dans le but d'éliminer l'infection de l'hôte. Dans les modèles d'infections virales, les lymphocytes T CD8 naïfs peuvent acquérir différentes propriétés de cellules effectrices et de cellules mémoires durant leur activation et différenciation.

La nomenclature chez la souris se base sur l'expression des marqueurs KLRG1 et CD127. Le CD127 correspond à la chaîne spécifique du récepteur de l'IL-7 (IL-7R) (Sarkar, Kalia et al. 2008). L'IL-7 joue un rôle essentiel dans le développement intrathymique des lymphocytes T (Murray, Suda et al. 1989, El Kassar, Lucas et al. 2004). Tant chez l'humain que chez la souris, l'IL-7 fournit un signal essentiel dans le maintien du répertoire de lymphocytes T naïfs (Tan, Dudl et al. 2001, Silva, Albuquerque et al. 2017). Les lymphocytes T naïfs expriment tous cette chaîne, toutefois, durant l'activation et la différenciation certains lymphocytes T caractérisés par des propriétés effectrices perdent leur dépendance à cette cytokine et n'expriment donc plus le CD127. La présence de la chaîne spécifique du récepteur à l'IL-7 (CD127) est utilisée pour distinguer les lymphocytes T mémoires, qui conservent CD127, des lymphocytes T effecteurs terminaux, qui perdent CD127 (Sarkar, Kalia et al. 2008). Le KLRG1 est une lectine de type C inhibitrice qui est exprimée sur les lymphocytes T CD8 activés (Sarkar, Kalia et al. 2008).

Lorsque les lymphocytes T expriment de faibles niveaux de CD127, les scientifiques utilisent la présence du KLRG1 sur les cellules effectrices terminales alors que celui-ci est absent sur les précurseurs des cellules mémoires (Sarkar, Kalia et al. 2008). Selon Obar et collaborateurs, la caractérisation du phénotype des lymphocytes T CD8 varie au cours des réponses immunes déployées en réponse à une infection chez la souris. Ils ont proposé la caractérisation suivante des lymphocytes T CD8 activés qui a été adoptée par plusieurs groupes : les lymphocytes T CD127^{low}KLRG1^{low} représentent les cellules effectrices précoces ; les lymphocytes T CD127^{low} KLRG1^{high} sont des cellules effectrices de courte longévité ; les lymphocytes T CD127^{high} KLRG1^{low} sont des précurseurs des cellules mémoires ; et les lymphocytes T CD127^{high}KLRG1^{high} représentent des cellules effectrices doubles positives (Obar, Jellison et al. 2011, Mathieu, Beltra et al. 2015, Beltra, Bourbonnais et al. 2016).

La sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie chronique inflammatoire du système nerveux central (SNC). Malgré de nombreuses décennies de recherche active, l'étiologie de cette maladie reste toujours inconnue. La pathobiologie de la SEP est caractérisée par des plaques de démyélinisation, de la perte axonale et l'activation des cellules gliales dans le SNC (Wu and Alvarez 2011). Le spectre des symptômes cliniques des patients atteints de la SEP est vaste ; ils peuvent éprouver de la fatigue, des pertes sensorielles et de l'ataxie (Mills, Mirza et al. 2017). Le diagnostic de la SEP se base sur l'histoire clinique, l'apparition de plusieurs épisodes dans le temps (historique) et dans l'espace (plusieurs lésions au sein du SNC), la détection de lésions par imagerie en résonance magnétique (IRM), et la détection de bandes oligoclonales d'anticorps dans le liquide cérébro-spinal des patients (Goldenberg 2012).

La SEP affecte environ 2,3 millions de personnes dans le monde (Eskandarieh, Heydarpour et al. 2016); on estime qu'il y a plus 100 000 patients au Canada seulement (<https://mssociety.ca/>). Le nombre de femmes affectées par cette maladie est environ deux à trois fois plus élevé que celui des hommes (Alonso and Hernán 2008). De nombreuses études ont montré qu'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux prédispose certaines personnes au développement de cette maladie. Certains groupes ethniques semblent être beaucoup moins affectés par la SEP. Par exemple, les Afro-Américains ont 40 % moins de risque de développer la SEP qu'un Américain Caucasien (Ramagopalan, Dobson et al. 2010). Les facteurs génétiques susceptibles d'influencer le développement de la maladie comprennent une centaine de gènes, dont les allèles des gènes codant pour les molécules du CMH classe II et classe I (HLA) (Dyment, Ebers et al. 2004) (Bashinskaya, Kulakova et al. 2015), la chaîne alpha du récepteur de l'IL-7 et le CD6 (Bashinskaya, Kulakova et al. 2015). Les allèles des gènes du HLA exercent la plus grande influence génétique sur les risques de développer la SEP (Bashinskaya, Kulakova et al. 2015). Cependant, ils ne sont pas déterminants et ne suffisent pas pour prédire le développement de la maladie dans tous les cas (Ramagopalan, Dobson et al. 2010).

Parmi les facteurs environnementaux, la localisation géographique et les taux de vitamine D semblent avoir une influence sur la prévalence de cette maladie (Kocovska, Gaughran et al. 2017). En effet, la prévalence la plus forte de cette maladie se trouve dans les pays à plus haute latitude comme le Canada et les pays d'Europe du Nord (Eskandarieh, Heydarpour et al. 2016).

Des bas niveaux de vitamine D ont été détectés chez les patients atteints de la SEP (Kocovska, Gaughran et al. 2017). De plus, l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV) a été identifiée comme un potentiel facteur de risque. La majorité des personnes atteintes de la SEP ont été infectées par l'EBV (Ramagopalan, Dobson et al. 2010). De plus, les gens qui ont eu la mononucléose ont un plus grand risque de développer la SEP (Eskandarieh, Heydarpour et al. 2016). Toutefois, étant donné la haute prévalence de l'infection EBV dans la plupart des populations, un rôle causatif pour cette infection dans le développement de la SEP n'a pas encore été démontré de façon déterminante. Des études ont montré que les fumeurs de la cigarette ont un risque plus élevé de développer la SEP et/ou de développer une SEP plus sévère (Hawkes 2007, Ramagopalan, Dobson et al. 2010).

Les types de SEP

La SEP peut se présenter sous différentes formes cliniques. La forme la plus commune est la forme cyclique (*relapsing-remitting*) qui affecte 85 % des patients atteints de SEP (Goldenberg 2012). Elle se caractérise par des périodes de poussées suivies de période de rémission, où les symptômes s'améliorent ou disparaissent (Goldenberg 2012). Environ la moitié des patients atteints de la forme cyclique développent par la suite la forme secondaire progressive. Chez les patients atteints de la forme secondaire progressive, la maladie s'aggrave et il n'y a plus de périodes de rémission. Finalement, environ 10 % des patients sont atteints de la forme primaire progressive de la SEP (Goldenberg 2012) ; chez ces patients les symptômes s'aggravent dès le début de la maladie.

Caractéristiques des lésions de la SEP

Les lésions au sein du SNC des patients atteints de la SEP se caractérisent par des plaques de démyélinisation, des pertes axonales et une activation des cellules gliales qui incluent les microglies et les astrocytes. Ces lésions sont classifiées selon une progression dans le temps (Kuhlmann, Ludwin et al. 2017) (Wu and Alvarez 2011): lésions aiguës, chroniques actives ou chroniques silencieuses (Kuhlmann, Ludwin et al. 2017). Les lésions aiguës démontrent des signes de démyélinisation récente avec des cellules myéloïdes contenant encore des débris de myéline récemment phagocytés. De plus, les lésions aiguës démontrent une infiltration leucocytaire importante dans des régions périvasculaires parenchymateuses et de l'œdème du

parenchyme cérébral (Wu and Alvarez 2011, Kuhlmann, Ludwin et al. 2017). Ces infiltrations de cellules sont composées majoritairement de lymphocytes T et de macrophages. Par opposition, les lésions dites chroniques possèdent une hypocellularité et du tissu cicatriciel formé par les cellules gliales (Wu and Alvarez 2011, Kuhlmann, Ludwin et al. 2017). Les cellules gliales, qui incluent les microglies et les astrocytes, démontrent des signes d'activation en réponse à l'inflammation locale.

Les infiltrations cellulaires dans la SEP

La présence des lymphocytes T en bordure des lésions suggère que l'inflammation est antigène dépendant (Wu and Alvarez 2011, Kuhlmann, Ludwin et al. 2017). Le rôle central des lymphocytes T CD4 spécifiques pour un antigène de la myéline dans le modèle de l'EAE a été largement démontré ; ces travaux ont nourri plusieurs investigations effectuées sur les tissus humains (Kuhlmann, Ludwin et al. 2017). Bien que la spécificité des lymphocyte T qui infiltre le SNC n'est pas bien connue, plusieurs groupes ont démontré que les lymphocytes des patients atteints de la SEP peuvent reconnaître une variété de peptides de la myéline tels que le MBP, le PLP le MOG et le MOBP (Wu and Alvarez 2011). Non seulement les lymphocytes T CD4 sont impliqués dans la destruction tissulaire dans la SEP, mais les lymphocytes T CD8 jouent aussi un rôle(Wu and Alvarez 2011).

Rôles des cellules immunitaires dans la SEP : lymphocytes T CD4, CD8 et T régulateurs

Les cellules immunitaires jouent un rôle crucial dans le développement de la SEP. Des lymphocytes (CD4 et CD8) auto réactifs contre des peptides de la myéline ont été détectés en plus grande quantité dans le sang et le CSF des patients atteints de la SEP (Ota, Matsui et al. 1990, Walker and Abbas 2002, Elong Ngonu, Pettre et al. 2012, Legroux and Arbour 2015) ; toutefois, d'autres équipes n'ont pu confirmer une telle différence de fréquence entre les patients et les témoins sains. Plusieurs groupes ont montré que les lymphocytes T spécifiques pour des antigènes de la myéline ont un phénotype plus activé et produisent plus de cytokine pro-inflammatoire (IL-2, IFN γ et TNF) comparativement aux témoins sains (Bielekova, Sung et al. 2004, Legroux and Arbour 2015). La présence de telles cellules autoréactives dans le sang suggère que celles-ci seraient d'abord activées en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires où l'antigène de la myéline est présenté. Ensuite, ces cellules activées migreraient

dans le SNC où elles pourraient être activées à nouveau (Legroux and Arbour 2015). Les données qui supportent une telle séquence d'événements chez les patients humains sont encore incomplètes.

Rôle des lymphocytes T CD4

Comme déjà mentionné aux pages 4 et 5 les lymphocytes T CD4 peuvent être polarisés en réponse à des signaux de leur environnement. Les cytokines IL-12 et IL-23, qui sont importantes dans la polarisation des lymphocytes T CD4 en Th1 et Th17, sont retrouvées en plus grande concentration dans le SNC des patients atteints de la SEP (Li, Chu et al. 2007). Les cytokines produites par ces réponses Th1 et Th17 (IFN γ , IL-17, IL22 et GM-CSF) sont présentes en plus grande concentration dans le liquide cérébro-spinal (CSF) et les lésions du SNC chez les patients (Kebir, Ifergan et al. 2009). Des lymphocytes T CD4 qui exprime à la fois les cytokines IL-17 et IFN γ sont retrouvés dans le SNC des patients SEP (Kebir, Ifergan et al. 2009). De plus, les lymphocytes T CD4 doubles positifs dans le sang ont une plus grande capacité de passer la barrière hémato-encéphalique et sont plus susceptibles de causer les dommages tissulaires observés dans la SEP (Kebir, Ifergan et al. 2009).

L'étude de l'impact des lymphocytes T CD4 dans le modèle EAE montre aussi le rôle des cellules Th1 et Th17 dans la pathogenèse (Legroux and Arbour 2015). La réponse Th1 chez l'EAE cause une augmentation de la production d'IFN γ et de l'infiltration cellulaire au niveau de la moelle épinière causant les signes cliniques typiques de l'EAE (Stromnes, Cerretti et al. 2008). Les cellules Th17 quant à elle produisent une EAE atypique où les infiltrations cellulaires se retrouvent plus au niveau du parenchyme cérébral (Stromnes, Cerretti et al. 2008).

Rôle des lymphocytes T CD8

Plusieurs études ont montré la présence de lymphocyte T CD8 dans les lésions de SEP (Legroux and Arbour 2015). Des lymphocytes T CD8 exprimant l'IL-17 (Tc17) sont présents en plus grande quantité dans les lésions du SNC des patients SEP (Mars, Saikali et al. 2011). Ces lymphocytes T CD8 ont un phénotype mémoire effecteur. Ils peuvent rester dans le tissu et causer des dommages lorsque l'antigène est rencontré à nouveau (Sallusto, Geginat et al. 2004, Mars, Saikali et al. 2011). De plus, ces cellules expriment plus de molécules d'adhésion (MCAM : *mélanoma cell adhesion molecule*) et expriment plus de molécules pro-

inflammatoires susceptibles de causer des dommages tissulaires (IL-17, IFN γ , GM-CSF et TNF). Comme déjà mentionné, les lymphocytes T CD8 reconnaissent la molécule de CMH de classe I. Les études génétiques sur les patients SEP montrent que certains allèles du HLA-A (un des loci du CMH classe I humain) augmentent le risque de développer la SEP (Brynedal, Duvefelt et al. 2007). Dans le contexte d'inflammation du SNC retrouvée dans la SEP, les cellules neurales et gliales surexpriment le CMH de classe I les rendant potentiellement plus susceptibles aux attaques des lymphocytes T CD8 activés (Legroux and Arbour 2015).

Plusieurs études ont montré que les lymphocytes T CD8 à proximité des lésions et des oligodendrocytes expriment plus de granules cytotoxiques (Lassmann 2004, Saikali, Antel et al. 2007). Les lymphocytes T CD8 ont aussi été impliqués dans la démyélinisation. Howe et collaborateurs ont investigué l'effet de la délétion de ces populations de lymphocytes cytotoxiques dans le modèle de démyélinisation induit par le virus Theiler. Leurs résultats montrent une amélioration de la locomotion et une conservation axonale dans la moelle épinière due à l'élimination des lymphocytes T CD8 (Howe, Ure et al. 2007).

Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs aident à maintenir la tolérance et prévenir les maladies auto-immunes (Legroux and Arbour 2015). Les lymphocytes T régulateurs sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (Treg) ou l'expression de l'IL-10 (Tr1) (Lowther and Hafler 2012). Ils sont capables de restreindre la production et la prolifération des autres populations de cellules immunitaires (Lowther and Hafler 2012). Ces cellules sont primordiales dans le maintien du système immunitaire. Une délétion ou une mutation du gène codant pour Foxp3 cause une auto-immunité systémique de naissance et la mort dans la première année de vie chez la majorité des patients (Lowther and Hafler 2012). L'implication des Treg a été étudiée dans le modèle EAE. Le transfert adoptif de lymphocytes Treg améliore la sévérité de l'EAE (Kleinewietfeld and Hafler 2014). Chez l'humain, il y a une augmentation des cellules Treg dans le CSF des patients SEP par rapport aux donneurs sains (Kleinewietfeld and Hafler 2014). Les capacités suppressives et régulatrices des lymphocytes T reg des patients SEP sont affectées (Kleinewietfeld and Hafler 2014). Cette observation est corrélée avec une diminution de l'expression de Foxp3 chez les patients SEP en comparaison des cellules saines (Kleinewietfeld and Hafler 2014).

Le rôle des cellules Tr1 a aussi d'abord été étudié dans le modèle EAE. Entre autre, des études montrent que la vitamine D joue un rôle dans la modulation des cellules immunitaires et dans la signalisation de l'IL-10 (Kleinewietfeld and Hafler 2014). En effet, une étude a montré que la combinaison de drogue immunosuppressive et de vitamine D3 induit la production de lymphocytes Treg productrice d'IL-10 sans la production des autres cytokines impliquées dans l'inflammation comme l'IFN γ et l'IL-5 (Kleinewietfeld and Hafler 2014). L'IL-10 joue un rôle bénéfique dans la pathogenèse de l'EAE (Kennedy, Torrance et al. 1992, Yu, Bamford et al. 2014). Les cellules Tr1 productrices d'IL-10 des patients atteints de la SEP produisent beaucoup moins d'IL-10 comparativement aux témoins sains (Kleinewietfeld and Hafler 2014).

Médicaments modificateurs de l'évolution de la SEP

Il n'y a présentement aucun traitement curatif pour la SEP. Un nombre croissant de traitements immunomodulateurs ou immunosuppresseurs sont utilisés afin de modifier l'évolution de la SEP ou influencer les mécanismes sous-jacents de cette maladie. Les traitements approuvés peuvent diminuer la sévérité de la maladie et des symptômes et potentiellement ralentir la progression de la maladie (Goldenberg 2012) (Cortese and Nath 2017). Au Canada, les médicaments modificateurs de l'évolution de la SEP incluent : plusieurs formulations de l'interféron-beta, l'acétate de glatiramère, le fingolimod, le tériflunomide, le natalizumab, l'alemtzumab, le daclizumab, et le diméthyl fumarate (<https://mssociety.ca/>). Lors de poussées importantes, les patients peuvent recevoir pour une courte période des corticostéroïdes afin de rapidement atténuer les réponses inflammatoires (Cortese and Nath 2017).

Interféron β

L'IFN β joue un rôle régulateur sur le système immunitaire (Goldenberg 2012). L'IFN β réduit l'incidence de poussée chez les patients SEP atteints de la forme cyclique. Bien que ce médicament s'est montré efficace pour réduire jusqu'à 80 % des lésions inflammatoires, les patients prenant ce médicament peuvent développer des anticorps neutralisants (Goldenberg 2012, Cortese and Nath 2017). Le médicament est alors moins inefficace et une autre stratégie de traitement doit être envisagée (Goldenberg 2012). Cette thérapie est utilisée depuis maintenant plus d'une vingtaine d'années et a démontré un profil d'effets de sécurité élevé à long terme (Goldenberg 2012, Cortese and Nath 2017).

Acétate du Glatiramère

L'acétate du glatiramère est un mélange de séquence d'acides aminés visant à mimer le peptide de la myéline MBP : *myelin binding protein* (Goldenberg 2012, Cortese and Nath 2017). Ce médicament a montré son efficacité en réduisant les attaques chez les patients atteints de la forme cyclique (Goldenberg 2012). À l'IRM, cette thérapie a réduit d'un tiers l'activité inflammatoire dans cerveau des patients (Goldenberg 2012, Cortese and Nath 2017). Ce médicament fait partie de l'arsenal de première ligne pour le traitement de la SEP et pour les patients qui ont une intolérance à l'IFN β (Goldenberg 2012).

Fingolimod

Le fingolimod fut la première thérapie orale approuvée pour le traitement de la SEP. Cette molécule agit sur les récepteurs S1P causant une diminution de l'expression des récepteurs responsables de la recirculation des lymphocytes vers l'extérieur des organes lymphoïdes. Ainsi, les cellules immunitaires sont maintenues au sein des organes lymphoïdes secondaires (Cortese and Nath 2017) ; les patients peuvent développer une lymphopénie plus sévère dans 18 % des cas (Cortese and Nath 2017). Le fingolimod agit davantage sur les compartiments cellulaires effecteurs, et affecte moins le compartiment mémoire (Cortese and Nath 2017).

Natalizumab

Il s'agit d'un anticorps monoclonal qui cible l'intégrine $\alpha 4$, une molécule d'adhérence cellulaire (Cortese and Nath 2017). Le blocage de cette intégrine prévient les cellules de migrer dans tous les organes incluant le SNC. Cette thérapie est efficace pour réduire les poussées (Cortese and Nath 2017). Cette thérapie comporte un risque très augmenté de développer la leucoencéphalopathie multifocale (PML). La PML est causée par une infection du virus JC qui infecte directement les oligodendrocytes et cause une importante démyélinisation qui peut être mortelle (Cortese and Nath 2017). Il semble que l'absence d'immunosurveillance au SNC permet à ce virus d'infecter et de causer ces importants dommages.

Alemtezumab

Cette molécule est un anticorps anti-CD52. Le CD52 est une glycoprotéine présente sur les lymphocytes T et B, les monocytes et les éosinophile (Cortese and Nath 2017). Cet anticorps cause une déplétion importante des cellules immunitaires en périphérie entraînant une

lymphopénie sévère (Cortese and Nath 2017). Malheureusement, certains patients traités à l'alemtzumab développent une prédisposition à la réactivation d'infections virales comme l'herpès et à une auto-immunité secondaire (glande thyroïde, thrombocytopenie)(Cortese and Nath 2017).

Les médicaments actuellement sur le marché ont pour effet d'améliorer la qualité de vie des patients SEP, cependant il reste beaucoup de travail à faire en recherche afin de trouver une thérapie curative pour la SEP. La recherche fondamentale utilise donc des modèles animaux, comme l'EAE, afin de comprendre mieux les mécanismes moléculaires impliqués.

Le modèle EAE

Le modèle de l'EAE est le modèle in vivo le plus utilisé pour les études sur la SEP. Des modèles actifs et passifs ont été développés et sont maintenant utilisés par de très nombreuses équipes. Pour les formes actives de l'EAE, les souris sont immunisées avec un peptide immunodominant de la myéline (MOG, PLP, etc.) selon les allèles du CMH de la souris en présence d'adjuvant complet de Freund et de hautes concentrations de *Mycobacterium tuberculosis* lyophilisés (McCarthy, Richards et al. 2012). La toxine pertussique est aussi injectée aux souris afin d'augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et l'activation efficace des lymphocytes (McCarthy, Richards et al. 2012, Ronchi, Basso et al. 2016). L'immunisation cause une activation efficace des lymphocytes T CD4 spécifiques pour l'antigène de la myéline injecté. Le rôle crucial des lymphocytes T a été confirmé par de nombreuses approches expérimentales dans ce modèle de maladie neuroinflammatoire (Ronchi, Basso et al. 2016, Lassmann and Bradl 2017) (McCarthy, Richards et al. 2012).

L'EAE classique induit une paralysie ascendante commençant par la queue, puis les membres postérieurs sont affectés pour finir avec une paralysie des membres antérieurs (McCarthy, Richards et al. 2012).

Dans le cas de l'EAE passive, des souris donneuses sont immunisées de la même façon que pour la forme active, puis au jour 7 à 8 post-immunisation (avant l'apparition des symptômes), les souris sont sacrifiées et les cellules des ganglions drainant le site d'immunisation et les splénocytes sont récoltés. Les lymphocytes sont restimulés in vitro pour 3 jours en présence du peptide de la myéline utilisé et de cytokines favorisant la survie et l'activation de cellules T

(McCarthy, Richards et al. 2012). Puis, les lymphocytes T réactivés in vitro sont transférés à des souris receveuses naïves par voie intrapéritonéale ou intraveineuse (McCarthy, Richards et al. 2012). Dépendamment de la question posée dans l'étude, différents types de cellules peuvent être isolés (CD4 ou CD8 par exemple) avant l'injection aux souris receveuses.

Le transfert adoptif de l'EAE peut se faire selon la polarisation effectuée in vitro avec les cytokines appropriées. Par contre, le type d'EAE obtenue peut varier selon la polarisation des cellules injectées. Les transferts adoptifs de cellules Th1 causent une EAE classique avec des infiltrations immunitaires majoritairement dans la moelle épinière (Damsker, Hansen et al. 2010). Le transfert adoptif de cellules polarisées Th17 donne une EAE atypique avec des infiltrats cellulaires plutôt au niveau du parenchyme cérébral (Damsker, Hansen et al. 2010).

Avantages des modèles EAE

Les modèles EAE partagent plusieurs caractéristiques avec la maladie humaine SEP. Dans les deux cas (EAE et SEP), la matière blanche montre des lésions de démyélinisation, des infiltrations cellulaires comprenant des lymphocytes T, des lymphocytes B et des macrophages qui phagocytent des débris de myéline (McCarthy, Richards et al. 2012). Ce modèle peut être induit chez plusieurs vertébrés (souris, rat, singe (Lassmann and Bradl 2017)). L'immunisation active ou EAE est avantageuse parce qu'il est facile à induire et elle peut être modulée afin d'observer une maladie aiguë ou chronique (Lassmann and Bradl 2017). Les transferts adoptifs sont avantageux pour l'étude des mécanismes d'immunosurveillance du SNC, de l'induction de l'inflammation du SNC et l'étude de l'impact des lymphocytes T sur les lésions et la pathogenèse (Lassmann and Bradl 2017). Ces modèles sont aussi bons pour les études de migration des lymphocytes T dans le SNC (Lassmann and Bradl 2017). Ils permettent aussi d'étudier la réactivation des cellules dans le SNC et quelle polarisation (Th1/Th17) est la plus pathogénique dans le développement de la maladie (Lassmann and Bradl 2017).

Limites des modèles EAE

Par contre, les modèles EAE ont certaines limites. Le modèle actif développe une maladie principalement dans la moelle épinière avec peu d'incidence dans le tronc cérébral et le cerveau ; les patients atteints de la SEP développent des lésions principalement dans le cerveau et moins

souvent dans la moelle épinière. Le modèle actif et le transfert adoptif des lymphocytes T CD4+ sont limités à l'étude de l'implication des différents types de réponses des lymphocytes T CD4 (Th1, Th17) et couvrent moins l'aspect de démyélinisation et remyélinisation retrouvé dans la SEP (Lassmann and Bradl 2017). En contrepartie, les lymphocytes T CD8 semblent être impliqués dans les plaques de démyélinisation des patients SEP (Lassmann and Bradl 2017). Les transferts adoptifs de lymphocyte T CD8 sont utilisés pour étudier leur impact dans la pathogenèse, mais ces modèles se sont montrés moins robustes jusqu'à maintenant par rapport aux modèles classiques de EAE (Lassmann and Bradl 2017).

Les cytokines

Les cellules synthétisent des cytokines, des messagers protéiques, afin de communiquer et d'agir sur d'autres cellules. Les cytokines servent de messager au sein du système immunitaire, mais aussi entre le système immunitaire et les autres systèmes. Les cytokines ont été classifiées en plusieurs familles sur la base de leur structure et leurs effets biologiques. Ces familles incluent : a) les interférons ($IFN\gamma$), b) les interleukines (IL), c) les chimiokines, d) les facteurs de croissance, et e) le *tumor necrosis factor* (TNF) (Kidd 2003, Bixler and Goff 2015). En général, les cytokines induisent une réponse via leur attachement à des récepteurs exprimés à la surface des cellules cibles. Ces messagers enclenchent une variété de mécanismes intracellulaires et nucléaires pouvant mener à la transcription et la traduction de gènes (Kidd 2003).

Dans le cadre de ce projet, il est question de la cytokine interleukine 15 (IL-15) et son implication dans la pathogenèse du modèle animal de la SEP. Cette cytokine nécessite le contact cellules-cellules pour faire son action. Elle est aussi la cible de plusieurs thérapies en cancer comme en auto-immunité. La biologie et les caractéristiques l'IL-15 sont présentées dans la prochaine section.

L'interleukine 15 (IL-15)

L'interleukine 15 (IL-15) est une cytokine qui contribue aux réponses du système immunitaire inné et adaptatif. Elle joue un rôle dans le maintien et l'homéostasie des cellules immunitaires (Abadie and Jabri 2014). Cette cytokine a été découverte par deux équipes dans les années 1990 à cause de sa capacité à faire proliférer les cellules immunitaires en absence d'IL-2 (Fehniger and Caligiuri 2001). En effet, sa ressemblance moléculaire avec l'IL-2 a mené à des études plus poussées sur la biologie de cette cytokine.

Biologie et structure de l'IL-15

L'IL-15 est une glycoprotéine de 14 KDa constituée de 114 acides aminés. La protéine possède 4 hélices alpha et est un membre de la famille que l'IL-2 (Patidar, Yadav et al. 2016). Le gène de l'IL-15 est situé sur le chromosome 4q31 chez l'humain et sur le chromosome 8 de la souris (Anderson, Johnson et al. 1995). Il contient 9 exons dont 7 sont codants (Fehniger and Caligiuri 2001). La grosseur du gène (32kbase) et le positionnement des exons sont très similaires entre l'humain et la souris (Krause, Jandrig et al. 1996). La protéine mature est codée par les exons 5 à 8 du gène (Anderson, Johnson et al. 1995, Fehniger and Caligiuri 2001). La séquence d'acides nucléiques de l'IL-15 est très conservée entre les espèces ; l'homologie entre l'humain et le singe atteint 97 % alors que la séquence protéique de la souris est homologue à 73 % à celle chez l'humain (Prinz, Hanisch et al. 1998, Fehniger and Caligiuri 2001). Dans toutes les espèces étudiées (souris, primate non humain, humain), l'IL-15 est sujette à des modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles (élaboré plus loin). Le précurseur de cette protéine possède une séquence de 162 acides aminés dont 48 sont clivés pour produire la protéine mature (Prinz, Hanisch et al. 1998). Chez l'humain et la souris, plusieurs isoformes de l'IL-15 sont observées et impliquées à différents niveaux dans le trafic intracellulaire qui est décrit plus loin. (Tagaya, Kurys et al. 1997).

L'IL-15 peut être exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages, les monocytes et les lymphocytes B. L'IL-15 peut aussi être exprimée par certaines cellules gliales comme les astrocytes et les microglies (Saikali, Antel et al. 2010, Abadie and Jabri 2014).

Régulation de l'expression IL-15 : transcription, traduction, trafic intracellulaire

Régulation transcriptionnelle

L'ARN messager (ARNm) de l'IL-15 est exprimé de manière constitutive par plusieurs types cellulaires (monocytes, cellules dendritiques, astrocytes) et organes (muscles squelettiques, cœur, poumon, etc.) (Patidar, Yadav et al. 2016). Les niveaux de cet ARNm augmentent en réponse à des signaux d'inflammation et/ou d'infections tels l'IFN γ et les lipopolysaccharides (LPS) (Waldmann and Tagaya 1999). La transcription du gène codant pour l'IL-15 est régulée par les facteurs de transcription *interferon regulatory factors* E (IRF-E) et le *nuclear factor-kappa B* (NF-kB) (Waldmann and Tagaya 1999, Patidar, Yadav et al. 2016).

Régulation traductionnelle

Les différences majeures observées entre les niveaux d'expression de l'IL-15 au stade ARNm et au stade protéique sont dues aux nombreux facteurs de régulation agissant sur la traduction et le trafic intracellulaire de cette cytokine. L'IL-15 est hautement régulée dans l'étape de la traduction de la séquence nucléique. Trois mécanismes qui régulent la production protéique de l'IL-15 ont été identifiés. Le premier est la présence de plusieurs codons AUG en amont du codon d'initiation qui donne une séquence 5' UTR très longue (465 nucléotides chez la souris et 352 nucléotides chez l'humain)(Waldmann and Tagaya 1999). Normalement, une région 5' UTR courte avec un seul codon AUG (celui d'Initiation) est préférable pour une traduction rapide et efficace. Il y a 5 codons AUG dans la séquence UTR murine et 12 dans la séquence UTR humaine. Une telle situation a été rapportée dans d'autres molécules immunitaires telles l'IL-7, l'IL-11, l'IL-13, l'IL-2R α , l'IL2-R β et l'IL-15R α (Waldmann and Tagaya 1999). Une délétion de ces séquences dans les des cellules COS transfectées a causé une augmentation de plus de 15 fois la production de la protéine IL-15(Bamford, DeFilippis et al. 1998). Un deuxième élément qui participe à la régulation post traductionnelle de la protéine, est la présence du long peptide signal de 48 acides aminés présent dans l'isoforme longue de la protéine IL-15 (Bamford, DeFilippis et al. 1998, Waldmann and Tagaya 1999). Lorsque Bamford et collègues ont interchangé les peptides signaux de l'IL-15 et l'IL-2 dans des cellules COS transfectées ils ont mesuré une augmentation de 20 fois des quantités de la protéine IL-15 lorsque ce gène était

flanqué de la séquence peptide signal de l'IL-2. La longue séquence de 48 acides aminés de cette isoforme agit donc comme régulateur négatif de la production protéique (Bamford, DeFilippis et al. 1998, Waldmann and Tagaya 1999). Le troisième élément limitant la traduction de la protéine se trouve dans la région en C-terminal de la protéine. L'insertion d'une séquence FLAG dans la région C-terminale de la protéine afin de suivre la protéine, lorsque produite (Bamford, DeFilippis et al. 1998, Waldmann and Tagaya 1999) a causé une augmentation de 10 fois de la production de la protéine IL-15. Lorsque les trois mécanismes ont été combinés dans les cellules COS transfectées : éliminer les codons AUG en amont de celui d'initiation, changer le signal peptide pour celui de l'IL-2 et enlever l'élément négatif régulateur en C-terminale, l'expression de l'IL-15 a été de 250 fois plus élevée (Bamford, DeFilippis et al. 1998, Waldmann and Tagaya 1999). Ces expériences ont démontré la contribution de ces trois mécanismes à contrôler de façon très importante les niveaux de protéine d'IL-15 produite.

Trafic intracellulaire

Il existe deux isoformes de la protéine IL-15 qui résultent de l'épissage alternatif des peptides signaux. L'isoforme longue possède une séquence de 48 acides aminés comme peptide signal alors que l'isoforme courte possède une séquence de 21 acides aminés (Patidar, Yadav et al. 2016). Ces deux isoformes codent pour une protéine mature, mais elles empruntent des voies intracellulaires différentes. L'isoforme longue mature passe dans l'appareil de Golgi, les endosomes et le réticulum endoplasmique alors que l'isoforme courte est retrouvée dans le cytoplasme et le noyau (Patidar, Yadav et al. 2016).

Le récepteur à l'IL-15

L'IL-15 est un membre de la famille des cytokines qui possède la chaîne commune gamma (γ_c) dans leur récepteur comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-21. Le récepteur de l'IL-15 se compose de 3 chaînes. La chaîne alpha (IL-15R α) est la chaîne de haute affinité de l'IL-15. Les deux autres chaînes se retrouvent sur la cellule qui répond à l'IL-15 et est composée de la chaîne commune gamma (γ_c) et la chaîne beta (IL-15R β).

IL-15R α

L'IL-15 possède une chaîne alpha (IL-15R α) de haute affinité qui fait partie du complexe récepteur. L'IL-15R α se distingue par le degré d'affinité, qui est 1000 fois plus élevé pour l'IL-15 que l'affinité de l'IL-2R α pour l'IL-2 (Fehniger and Caligiuri 2001, Van den Bergh, Lion et al. 2017). Huit transcrits différents de la chaîne IL-15R α humaine ont été rapportés dus à des épissages alternatifs d'exons. Ces variantes d'ARNm contiennent ou non l'exon 2 du gène IL-15R α . Les études ont montré que l'exon 2 de l'IL-15R α est essentiel pour que la cytokine se fixe sur son récepteur α (Dubois, Magrangeas et al. 1999). L'IL-15R α peut être exprimé par de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les monocytes, les lymphocytes B, les microglies, les astrocytes, et les cellules épithéliales (Dubois, Magrangeas et al. 1999).

Mécanisme de présentation/sécrétion de l'IL-15

Les études décrivent trois modes de présentation/sécrétion de l'IL-15. Le premier se nomme la présentation en cis où l'IL-15 est soluble et se lie ensuite avec son récepteur de haute affinité l'IL-15R α (Castillo and Schluns 2012). Ce mécanisme est indépendant de la source d'IL-15, contrairement aux mécanismes paracrine et autocrine où la source de la cytokine est connue (Castillo and Schluns 2012). La deuxième méthode est le clivage et la relâche du complexe IL-15/IL-15R α par les cellules sources d'IL-15. Le complexe peut donc retrouver une cellule effectrice exprimant l'autre moitié du récepteur. Dans ce contexte la source d'IL-15 est connue (Castillo and Schluns 2012). Le troisième mécanisme est connu pour être le plus utilisé par cette cytokine et se nomme la présentation en trans. Ce mécanisme consiste en la formation du complexe IL-15/IL-15R α dans le réticulum endoplasmique/appareil de Golgi de la cellule exprimant la cytokine, puis à sa migration sur la membrane cellulaire où il est bioactif (Castillo and Schluns 2012, Van den Bergh, Lion et al. 2017). Les cellules qui répondent à l'IL-15 (exprimant le complexe récepteur IL-15R $\beta\gamma$) doivent effectuer un contact avec ces cellules pour permettre la signalisation (Van den Bergh, Lion et al. 2017). Le récepteur IL-15R α agit en chaperonne pour l'amener à la surface cellulaire. Certaines cellules comme les cellules NK ont besoin du contact cellule-cellule pour répondre à l'IL-15 (Mortier, Woo et al. 2008). La forme de l'IL-15 retrouvée en plus grande quantité dans des liquides physiologiques humains et murins est la forme IL-15/IL-15R α (Bergamaschi, Bear et al. 2012).

Cellule présentatrice d'antigène

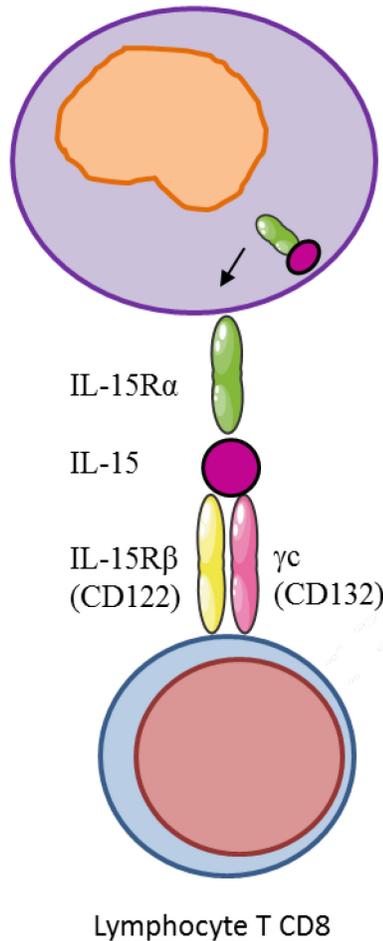


Figure 1. La transprésentation de l'interleukine 15

L'IL-15 n'est pas sécrétée comme l'IL-2 peut l'être. Cette Cytokine a besoin d'une communication cellule-cellule. L'IL-15 est produite, dans cet exemple, par une cellule présentatrice d'antigène et est couplée avec son récepteur alpha et mise à la surface cellulaire. La cellule productrice doit donc entrer en contact avec une cellule qui répond à cette cytokine et qui exprime les deux autres chaînes du récepteur pour permettre une signalisation cellulaire.

Voies de signalisation associées à l'IL-15

Complexe récepteur $\beta\gamma$

La chaîne bêta (IL-2/15 R β ou CD122) du récepteur à IL-2 ainsi que la chaîne commune gamma (γ_c ou CD132) forment le récepteur à l'IL-15. Cette dernière est aussi partagée avec d'autres cytokines telles que l'IL-4, l'IL-9 et l'IL-7 (Fehniger and Caligiuri 2001). En grande concentration, l'IL-15 peut se lier au complexe récepteur $\beta\gamma$ (CD122/CD132) en absence de l'IL-15R α et activer les voies de signalisation intracellulaires (Anderson, Kumaki et al. 1995). Le complexe récepteur $\beta\gamma$ peut être exprimé par les lymphocytes T, les cellules NK et les cellules NKT (Fehniger and Caligiuri 2001).

Comme l'IL-15 partage ses sous-unités de récepteur avec l'IL2, les voies de signalisation activées sont semblables entre ces deux cytokines. L'IL-15 active les voies *Janus-associated Kinase* (JAK) et les *signal transducer and activator of transcript* (STAT) (Mishra, Sullivan et al. 2014). La sous unité β (CD122) du récepteur à l'IL-15 active la kinase JAK1 qui peut ensuite phosphoryler STAT3 (Mishra, Sullivan et al. 2014). La sous unité γ (CD132) du récepteur à l'IL-15, tant qu'à elle, active la kinase JAK3 qui phosphoryle STAT5. Les hétérodimères STAT5/STAT3, formés par ces événements de phosphorylation, sont transloqués au noyau où ils activent des facteurs de transcription anti-apoptotiques comme le *B cell lymphoma* (Bcl-2) (Mishra, Sullivan et al. 2014). L'IL-15 induit aussi les voies *mitogen activated protein kinase* Ras/MAPK qui activent aussi l'activation de facteurs de transcription anti-apoptotiques et préviennent la mort cellulaire. En contrepartie, cette cytokine diminue la production de protéines proapoptotiques comme Bim et Puma par l'activation de la voie phospho inositol kinase (PI3K) (Mishra, Sullivan et al. 2014).

Rôle, fonction et expression de l'IL-15

Comme déjà mentionné, l'IL-15 joue un rôle autant dans le système immunitaire inné et adaptatif. Elle peut être exprimée par les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les cellules endothéliales et certaines cellules du stroma des tissus (Abadie and Jabri 2014). Principalement, elle régule l'homéostasie et la prolifération des cellules

immunitaires. L'IL-15 est surexprimée pendant plusieurs types d'infections et de maladies inflammatoires chroniques (Castillo and Schluns 2012).

Rôle dans le système immunitaire inné

Le rôle de l'IL-15 dans le système immunitaire inné est de promouvoir une réponse rapide contre les pathogènes dans les tissus gastro-intestinaux en incitant les cellules NK et les cellules lymphoïdes innées à produire de l'interféron γ (IFN γ) (Fuchs, Vermi et al. 2013, Pagliari, Cianci et al. 2013, Abadie and Jabri 2014). Plus précisément, l'IL-15 induit le développement et la prolifération des cellules NK et NKT (Pagliari, Cianci et al. 2013, Abadie and Jabri 2014). Les souris déficientes pour l'IL-15, l'IL-15R α ou l'IL-15R β ont une diminution marquée du nombre de cellules NK. Les cellules NK ont aussi besoin que cette cytokine soit trans-présentée par une cellule exprimant le CD11b pour induire leur prolifération. Leur différenciation est régulée par le récepteur inhibiteur Ly49 chez la souris (Pagliari, Cianci et al. 2013). L'IL-15 augmente la cytotoxicité et la production de cytokines des cellules NK.

Du côté des cellules présentatrices d'antigènes, même si les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages sont aussi les plus grandes cellules productrices d'IL-15 (Pagliari, Cianci et al. 2013) elles répondent aussi à cette cytokine. L'IL-15 augmente leur capacité de phagocytose, et de sécrétion de l'IL-6, de l'IL-18 et du TNF (Pagliari, Cianci et al. 2013). Par opposition, une faible concentration d'IL-15 cause la sécrétion d'IL-10 par les monocytes (Pagliari, Cianci et al. 2013). L'IL-15 a aussi la capacité de convertir les monocytes en cellules dendritiques (De, Laudanski et al. 2003). Les cellules dendritiques stimulées avec de l'IL-15 augmentent l'expression de CD86, de CD40 et du CMH de classe II. Elles sont aussi résistantes à l'apoptose et expriment plus d'IFN γ (Pagliari, Cianci et al. 2013).

L'IL-15 joue aussi un rôle sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ retrouvés en minorité dans le sang, mais en plus grande quantité parmi les lymphocytes T intraépithéliaux de l'intestin. L'IL-15 induit la prolifération des lymphocytes $\gamma\delta$ chez l'humain et la souris (Nishimura, Hiromatsu et al. 1996, Garcia, Jullien et al. 1998)

Rôle dans le système immunitaire adaptatif

Dans le système immunitaire adaptatif, l'IL-15 joue un rôle dans le maintien et la prolifération des cellules T CD8. La survie des lymphocytes T CD8 mémoires est dépendante de la trans-

présentation de l'IL-15 par les cellules dendritiques (Pagliari, Cianci et al. 2013). L'IL-15 augmente leur cytotoxicité et la production de cytokines. L'IL-15 induit un profil de lymphocyte cytotoxique par l'augmentation de l'expression de récepteurs d'activation tels que le NKG2D et le complexe CD94/NKG2C ; cette cytokine peut augmenter chez les lymphocytes T CD8 l'acquisition de propriétés associées généralement aux cellules NK (Pagliari, Cianci et al. 2013). Malgré l'utilisation des mêmes chaînes de signalisation dans le récepteur pour l'IL-15 et l'IL-2, de nombreux travaux ont démontré que ces cytokines ont des impacts distincts. Par exemple, l'IL-15 ne favorise pas l'expansion des lymphocytes T régulateurs tel que cela est bien documenté pour l'IL-2 (Zorn, Mohseni et al. 2009). De plus, des études ont montré que l'IL-15 rend les lymphocytes T CD4 et CD8 résistants aux actions des lymphocytes T régulateurs (Pagliari, Cianci et al. 2013). L'impact de l'IL-15 sur le développement de lymphocytes T Th17 et la production de cytokine telle l'IL-17 demeure controversé. Un groupe a publié des données obtenues chez des souris déficientes pour l'IL-15 suggérant que cette cytokine supprime la production de lymphocytes T Th17 (Pandiyani, Yang et al. 2012). Un autre groupe a aussi suggéré que les lymphocytes T CD8 exprimant le récepteur CD122 (Yu, Bamford et al. 2014), pouvant donc répondre à l'IL-15, peuvent réguler de façon négative les lymphocytes T Th17 (Yu, Bamford et al. 2014). Lorsque ces chercheurs ont utilisé un anticorps bloquant le CD122 dans un modèle d'EAE, la sévérité des symptômes a été augmentée (Yu, Bamford et al. 2014). Toutefois, plusieurs autres publications ont montré la capacité de l'IL-15 à augmenter la production d'IL-17 par les lymphocytes T humains et murins (Ziolkowska, Koc et al. 2000, Ferretti, Bonneau et al. 2003, Cho, Ju et al. 2007, Wan, Kozhaya et al. 2011). Des études supplémentaires seront nécessaires afin d'élucider les effets de l'IL-15 sur les lymphocytes Th17 et leur production de cytokines.

Enfin, chez les lymphocytes B, l'IL-15 *in vitro* induit aussi la prolifération, augmente la sécrétion d'immunoglobulines et inhibe l'apoptose de la voie FAS dépendante (Pagliari, Cianci et al. 2013).

Rôle de l'IL-15 dans les maladies

Dans le contexte de maladies, l'IL-15 est considérée comme une cytokine pertinente pour augmenter le succès des immunothérapies du cancer, alors que cette même cytokine semble jouer un rôle délétère dans les maladies auto-immunes/inflammatoires (Abadie and Jabri 2014).

IL-15 dans le cancer

Depuis maintenant plus d'une décennie, l'immunothérapie a fait ses preuves dans le domaine du cancer ; des inhibiteurs de molécules régulatrices (e.g. CTLA-4, PD-1) ont permis d'augmenter le succès de telles approches (PD-1, PDL-1) (Rautela and Huntington 2016). Les études se penchent constamment sur d'autres mécanismes cellulaires qui pourraient être ciblés par des immunothérapies. L'IL-15 de par ses propriétés sur le maintien et la survie des cellules NK et des lymphocytes T CD8 est devenue une molécule de choix pour augmenter les approches visant à neutraliser ou détruire les cellules cancéreuses responsables de la formation des tumeurs (Rautela and Huntington 2016). Les infusions d'IL-15 chez le singe ont montré une augmentation de l'ordre de 100 fois du nombre de cellules NK circulantes et une augmentation des cellules T mémoires CD8 (Waldmann 2014). De plus, cette cytokine s'est montrée efficace chez les modèles murins de cancer et a fait partie d'essais cliniques sur des patients métastatiques (Waldmann 2014).

IL-15 dans la polyarthrite rhumatoïde

Dans un autre ordre d'idée, l'IL-15 joue aussi un rôle dans d'autres maladies inflammatoires telle la polyarthrite rhumatoïde. C'est une maladie chronique inflammatoire qui attaque les articulations du corps. L'inflammation des membranes synoviales est impliquée dans la destruction du cartilage et les os. Les études ont montré que des cytokines comme l'IL-1, le *TNF* et l'IL-6, qui sont présents en plus grande quantité dans le sérum de ces patients, participent à la pathobiologie de cette maladie (Yang, Xu et al. 2015). L'IL-15 est aussi retrouvée en plus grande quantité dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Yang, Xu et al. 2015). Dans le modèle murin, les injections d'IL-15 entraînent une augmentation des infiltrats cellulaires dans les articulations, constitués majoritairement de cellules T (McInnes, al-Mughales et al. 1996). L'IL-15 active et recrute les lymphocytes T dans la membrane synoviale qui contribuent à la pathogenèse de cette maladie inflammatoire (McInnes, al-Mughales et al. 1996).

L'IL-15 dans la maladie de cœliaque

La maladie de cœliaque est une maladie inflammatoire caractérisée par le développement d'anticorps contre le gluten et l'enzyme transglutaminase (Abadie and Jabri 2014). Cette

maladie est caractérisée par une augmentation des lymphocytes épithéliaux intestinaux (EIL), et une hyperplasie des cryptes de l'intestin (Abadie and Jabri 2014). L'IL-15 est aussi impliquée dans les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin ; la cytokine est surexprimée dans la lamina Propria de l'intestin des patients atteints de la maladie de cœliaque (Abadie and Jabri 2014). L'IL-15 favorise l'expression des récepteurs activateurs des cellules NK (NKG2D et NKG2C) sur les cellules IEL favorisant un phénotype cytotoxique détruisant l'épithélium de l'intestin (Jabri and Abadie 2015).

IL-15 dans le SNC

Des travaux effectués sur des cultures de cellules de rat ont suggéré que l'IL-15 et les chaînes de son récepteur jouent un rôle dans la différenciation des progéniteurs de cellules neurales (Huang, Cheng et al. 2009). L'IL-15R α est exprimé par les neurones pendant leur différenciation, mais cette chaîne est absente sur les astrocytes et les précurseurs d'oligodendrocytes chez la souris (Huang, Cheng et al. 2009). L'ajout d'IL-15 sur les neurones murins en culture a causé la phosphorylation de STAT3 et a réduit la croissance des neurites (Huang, Cheng et al. 2009). L'impact de l'IL-15 sur la mémoire et la biochimie du SNC a été investigué dans des modèles de souris (He, Hsueh et al. 2010). Les souris déficientes pour l'IL-15R α ont démontré des déficits au niveau de la mémoire ; la concentration du neurotransmetteur GABA, mais pas celle d'autres neurotransmetteurs, était légèrement diminuée dans la région hippocampique de ces souris (He, Hsueh et al. 2010). L'ajout d'IL-15 sur des neurones en culture *in vitro* a diminué la consommation de GABA par ces cellules (He, Hsueh et al. 2010). Toutefois, il est pertinent de mentionner que les travaux décrits dans ce paragraphe ont été peu cités depuis leur publication et n'ont pas été confirmés par d'autres équipes.

Plusieurs groupes ont montré l'implication de l'IL-15 dans les modèles murins de neuroinflammation. Gomez et collaborateurs ont montré que l'expression de l'IL-15 augmente jusqu'à 3 jours après une constriction des nerfs (Gomez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008). Les injections dans le nerf sciatique (système nerveux périphérique) ont causé une infiltration massive de macrophages et de lymphocytes T dans le parenchyme du nerf (Gomez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008). À l'inverse, le blocage avec un anticorps anti-IL-15 a réduit les infiltrations de macrophages et de lymphocytes T. L'IL-15 dans le SNC a aussi causé une

activation des cellules gliales comme les astrocytes et les microglies (Gomez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008). Les injections de LPS directement dans le SNC de souris ont induit une augmentation de l'expression de l'IL-15 par les astrocytes et les microglies activées. Ces résultats montrent le rôle potentiel de l'IL-15 dans les réponses neuro-immunitaires (Gomez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008). Pan et collaborateurs ont observé dans le modèle d'injection de LPS que les souris déficientes en IL-15R α avaient un rythme circadien de température perturbé suggérant un rôle bénéfique de l'IL-15R α pour contrer la neuroinflammation (Pan, Wu et al. 2011).

IL-15 dans la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui attaque les neurones dopaminergiques de la substance noire du striatum. Un rôle pour des mécanismes immunologiques dans la neuro-dégénération et la mort cellulaire a été proposé (Rentzos and Rombos 2012). Des microglies exprimant des niveaux élevés de TNF et d'IL-6 ont été retrouvées dans la substance noire. Des cytokines inflammatoires ont aussi été mesurées dans le striatum des patients en comparaison à des contrôles (Rentzos and Rombos 2012). L'expression de CCL5 une chimiokine impliquée dans l'infiltration cellulaire et le homing des cellules est induite par l'IL-15 (Gangemi, Basile et al. 2003). CCL5 et l'IL-15 ont aussi été retrouvés en plus grande concentration dans le sérum des patients atteints de la maladie de Parkinson comparativement aux témoins sains. Toutefois, des travaux supplémentaires seront nécessaires afin d'élucider la contribution de l'IL-15 à cette pathologie.

IL-15 dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par des plaques séniles constituées d'accumulation de filaments neurofibrillaires et le développement d'une démence. Un nombre croissant d'études suggèrent que l'inflammation est impliquée dans les lésions observées chez les patients atteints de cette maladie (Rentzos and Rombos 2012). Des niveaux élevés des cytokines telles l'IL-1 et l'IL-6 ont été mesurés dans le cerveau de ces patients (Vandenabeele and Fiers 1991, Strauss, Bauer et al. 1992). Des cellules gliales réactives sont aussi observées dans les tissus post-mortem de patients Alzheimer (AD) (McGeer, Kawamata et al. 1993). Certaines études ont détecté des niveaux d'IL-15 plus élevée dans le CSF des

patients atteints de la maladie d'Alzheimer que dans ceux de donneurs contrôles, toutefois les niveaux observés étaient très bas (moins de 10 pg/ml) et devront être confirmés par d'autres études (Rentzos and Rombos 2012).

IL-15 dans la sclérose en plaques

Notre laboratoire a montré que les proportions de lymphocytes B et les monocytes du sang périphérique qui expriment de l'IL-15 de surface sont plus élevées chez les patients atteints de la SEP que chez des donneurs sains (Schneider, Mohebiany et al. 2011). Cette expression augmentée d'IL-15 par ces leucocytes permet d'augmenter la production du granzyme B par les lymphocytes T CD8 lors de tests en co-culture (Schneider, Mohebiany et al. 2011). De plus, les lymphocytes T CD8 ayant été exposés à l'IL-15 ont une plus grande capacité à traverser une barrière hémato-encéphalique *in vitro* et à causer la mort de cellules gliales (Schneider, Mohebiany et al. 2011). De plus, l'expression de l'IL-15 est augmentée au sein des lésions du SNC des patients atteints de la SEP. La majorité des astrocytes détectables dans ces lésions expriment de l'IL-15 et de nombreux lymphocytes T CD8 ayant infiltré le SNC se trouvent à proximité (Saikali, Antel et al. 2010). L'IL-15 a aussi été détectée sur les microglies/macrophages des tissus post-mortem de patients SEP (Saikali, Antel et al. 2010). Ces travaux démontrent que l'expression protéique de l'IL-15 est augmentée dans le sang et dans le SNC de patients atteints de la SEP en comparaison à des témoins. De plus, ces niveaux élevés d'IL-15 contribuent à augmenter les propriétés cytotoxiques des lymphocytes T CD8.

IL-15 dans le modèle EAE

Il a été montré que l'IL-15 peut passer la barrière hémato-encéphalique et qu'il en résulte une surexpression de l'IL-15R α dans le cerveau des souris EAE (Hsuchou, Pan et al. 2009). Des études menées sur des souris déficientes pour l'IL-15 ont rapporté des symptômes plus sévères de l'EAE que chez des souris sauvages (Gomez-Nicola, Spagnolo et al. 2010, Wu, Pan et al. 2010, Pandiyan, Yang et al. 2012). Le phénotype est du moins récupéré lorsque la cytokine est injectée aux souris au cours de l'EAE (Gomez-Nicola, Spagnolo et al. 2010, Wu, Pan et al. 2010, Pandiyan, Yang et al. 2012). Pandiyan et collaborateurs ont montré, dans leur modèle, qu'en absence d'IL-15 il y a une plus grande réponse Th17 qui contribue au développement de l'EAE. Lorsque l'IL-17 est bloquée avec un anticorps chez les souris déficientes pour l'IL-15,

les scores cliniques d'EAE redeviennent similaires aux souris sauvages. Leurs résultats suggèrent que l'IL-15 a un rôle bénéfique dans l'inhibition de la pathogenèse de l'EAE (Pandiyana, Yang et al. 2012). Ces groupes ont seulement injecté la cytokine aux souris EAE. Des études ont montré que la forme bioactive de l'IL-15 se trouve couplée à IL-15R α . Le complexe IL-15/IL-15R α induit la prolifération des lymphocytes T CD8 et modifie la conformation de la cytokine qui augmente l'avidité pour le complexe récepteur $\beta\gamma$ (Rubinstein, Kovar et al. 2006). L'utilisation du complexe augmente la fonction effectrice des lymphocytes T CD8 et des cellules NK. La stimulation chronique par le complexe IL-15/IL-15 R α augmente la proportion de cellules NK matures (Elpek, Rubinstein et al. 2010). Les lymphocytes T CD8 montrent un phénotype activé avec des fonctions effectrices robustes. Par contre, une exposition trop longue de ce complexe provoque une diminution de la capacité des cellules NK à répondre (Elpek, Rubinstein et al. 2010). Il est important de noter que les études effectuées avec des souris déficientes pour l'IL-15 n'ont pas tenu compte des altérations au système immunitaire chez celles-ci par rapport à leurs consœurs sauvages. La diminution de nombre de cellules NK, de lymphocytes T CD8 mémoires, de lymphocytes T $\gamma\delta$ et de cellules dendritiques (Kennedy, Glaccum et al. 2000, Pagliari, Cianci et al. 2013) chez ces souris pourrait avoir un impact majeur sur l'induction et le développement de l'EAE sans égard au rôle de l'IL-15.

Modèles de souris déficientes ou transgéniques pour IL-15/IL-15R α

Les souris déficientes en IL-15 et IL-15 R α de naissance, ont un système immunitaire différent des souris de type sauvage. Les souris déficientes pour l'IL-15 ont une réduction marquée des cellules NK matures et des lymphocytes T CD8. Les souris transgéniques surexprimant l'IL-15 humaine ont une augmentation de cellules NK, une augmentation de lymphocytes T CD8 et une augmentation de lymphocytes T $\gamma\delta$ (Marks-Konczalik, Dubois et al. 2000, Ranson, Vosshenrich et al. 2003). Dans ce modèle de souris, il y a une expansion du système immunitaire inné et une augmentation des cellules mémoires. L'IL-15 maintient la survie des lymphocytes T CD8 et inhibe la mort cellulaire induite par l'IL-2 (Marks-Konczalik, Dubois et al. 2000).

Les souris déficientes en IL-15/IL-15R α ont un phénotype particulier. Leur rythme circadien est altéré et elles ont un pourcentage de gras inférieur aux souris sauvages (Pistilli, Bogdanovich et al. 2011). Les souris déficientes en IL-15R α ont un phénotype plus athlétique suggérant l'implication de cette molécule dans les muscles squelettiques (Pistilli, Bogdanovich et al.

2011). En effet, les souris déficientes ont une plus grande résistance à la fatigue, une plus forte puissance oxydative au niveau des muscles qui permettent une plus grande résistance à l'exercice due à l'adaptation des mitochondries (Pistilli, Bogdanovich et al. 2011). Pour toutes ces raisons, nous croyons que l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-15 ou IL-15R α représente un défi pour l'interprétation d'un modèle de la SEP qui se base sur l'induction d'une réponse immunitaire robuste contre un antigène de la myéline et des mesures de symptômes cliniques d'ataxie et de paralysie.

Hypothèse et buts

Nous émettons l'hypothèse qu'une augmentation de l'expression de l'IL-15 en périphérie contribue à la sévérité de l'EAE et participe à aggraver la sévérité des symptômes la maladie.

Les buts de ce projet sont de

- Déterminer le patron d'expression de l'IL-15 à différents stades de l'EAE.
- Déterminer l'effet des injections périphériques d'IL-15 sur le développement de l'EAE chez les souris C57/BL6 sauvages.
- Déterminer l'effet des injections d'IL-15 sur la fréquence des différentes populations de cellules immunitaires en périphérie et dans le SNC.
- Déterminer le phénotype des cellules qui infiltrent le SNC suite aux injections d'IL-15 à différents stades de la maladie.

Matériel et Méthodes

Induction de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)

Induction

Le modèle de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) a été induit chez des souris C57BL/6 femelles âgées entre 8 et 12 semaines. Les souris ont reçu une émulsion sous-cutanée (SC) contenant un peptide de la myéline MOG₃₅₋₅₅ (Myelin oligodendrocyte glycoprotein) et de l'adjuvant complet de Freund. Deux jours après l'injection de l'émulsion, de la toxine pertussique a été injectée afin d'augmenter la perméabilité de la barrière hémencéphalique. Pour préparer l'adjuvant complet de Freund, 100 mg de Mycobactérium Tuberculosis (H37RA DIFCO 231141) ont été ajoutés à 10 mL d'adjuvant incomplet de Freund (DIFCO 233910). Le mélange (10 mg/mL) a été agité à 4 °C pendant 20 minutes. La solution a été diluée à une concentration de 8 mg/mL. Par la suite, la poudre de peptide MOG₃₅₋₅₅ a été diluée à une concentration de 10mg/mL avec de l'eau stérile et rediluée selon les quantités désirées pour l'émulsion. L'émulsion a été préparée en utilisant des seringues à émulsion et en diluant 1 :1 l'adjuvant complet de Freund et la solution contenant le peptide MOG₃₅₋₅₅ et mélangée jusqu'à une consistance de mayonnaise.

EAE : expression de l'IL-15 par qPCR

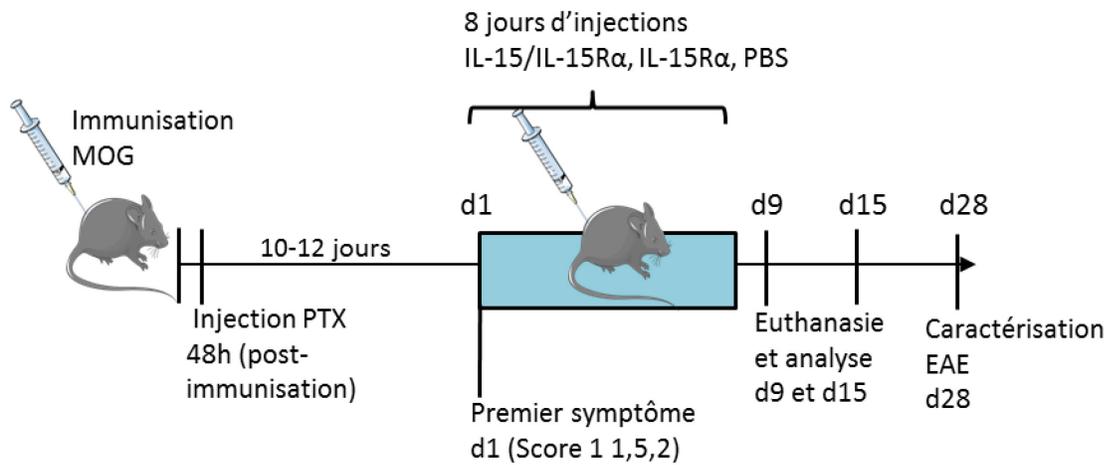
Pour les expériences d'expression d'IL-15, les souris ont reçu 200 ug de MOG₃₅₋₅₅ et 400ug de Mycobactérium Tuberculosis dans un volume total de 100 uL. Le volume d'injection a été divisé en deux (50uL/site) et injecté en SC dans la région lombaire des souris anesthésiées à l'isoflurane. Quarante-huit heures après les injections d'émulsion, la toxine pertussique (400ng/100uL) a été injectée par voie intrapéritonéale (IP) aux souris. La toxine en poudre a été reconstituée avec une solution saline physiologique (HBSS —Hank's Balanced Salt Solution) à une concentration de 100mg/mL puis diluée à une dose de 4 ug/ml pour les injections.

EAE : injection d'IL-15

Toutefois, les souris qui ont servi à évaluer l'impact de l'injection d'IL-15 ont reçu une quantité plus faible de MOG₃₅₋₅₅ (66 ug) afin d'induire une maladie moins sévère, car nous avons émis l'hypothèse que l'injection de la cytokine augmenterait les symptômes cliniques. Le volume d'injection a aussi été divisé en deux (50uL/site) et injecté en SC dans la région lombaire des souris anesthésiées à l'isoflurane. Quarante-huit heures après les injections d'émulsion, la toxine

pertussique (400ng/100uL) a été injectée par voie intrapéritonéale (IP) aux souris. La figure 2 représente le protocole et la résolution temporelle que nous avons établis pour les EAE injecté à l'IL-15.

Figure 2. schéma du protocole d'expérimentation



Suivi des souris

Les souris ont développé des signes cliniques environ 8 jours. pour les EAE à 200ug de MOG, et 10-12 jours pour les EAE de 66 ug .Les souris sont scorées selon l'échelle décrite dans le tableau 1. Les souris ont été suivies et pesées une fois par jour tout le long de l'expérience. Les souris ont été euthanasiées à la fin ou lorsqu'elles atteignaient un point limite établi par le comité interne de protection des animaux (CIPA).

Tableau I. Échelle de score clinique des souris EAE

	Description
1	La queue de la souris est paralysée. Elle se retourne rapidement lorsque tournée sur le dos
2	Queue paralysée. La souris reste sur le dos lorsque retournée.
2,5	Queue paralysée. La souris reste sur le dos lorsque retournée et a une faiblesse ou une boiterie des membres postérieurs.

3	Queue paralysée. La souris reste sur le dos lorsque retournée. Un membre postérieur paralysé. Préhension diminué des membres postérieurs.
3,5	Queue paralysée. La souris reste sur le dos lorsque retournée. Un membre postérieur paralysé et faiblesse du deuxième membre postérieur. Démontrant un ataxie des membres postérieurs.
4	Queue paralysée. La souris reste sur le dos lorsque retournée. Deux membres postérieurs paralysés.
4,5	Queue paralysée. La souris reste sur le dos lorsque retournée. Deux membres postérieurs paralysés. La souris a une faiblesse des membres antérieurs.
5	La souris est complètement paralysée. Elle est moribonde

Euthanasie et perfusion des souris

La perfusion sert à retirer le sang des organes afin d'analyser que le contenu du parenchyme. À la fin de l'EAE, ou à différents moments de la maladie, les souris ont été anesthésiées à l'aide d'une injection IP de barbiturique (Euthanyl). Lorsque l'animal n'avait plus de réflex de retrait, la cavité thoracique a été ouverte afin d'exposer le cœur. Une incision à l'aide d'un ciseau a été pratiquée dans le ventricule droit. Par la suite, une aiguille papillon 25 G a été insérée dans le ventricule gauche. À l'aide d'une pompe à perfusion, 50 mL de solution saline physiologique (PBS) ont été perfusés par le cœur pour enlever le sang des organes. Une fois la souris perfusée les organes ont été recueillis pour les analyses de cytométrie et de PCR quantitatif.

Expression d'IL-15 par PCR quantitatif

Extraction d'ARN de tissus de souris

Les organes (cerveau, tronc cérébral, moelle épinière et rate) ont été recueillis des souris perfusées au PBS. Les organes ont été mis individuellement dans les tubes cryogéniques. Un millilitre de TRIzol™ (Life Technologies, numéro catalogue 15596-018) a été ajouté aux tubes. Les organes ont été ensuite homogénéisés à l'aide d'un broyeur (polytron, Kinematica, PF-523-

0003-47) monté sur la mèche de 5 mm. Une fois les homogénats faits, 0,2 mL de chloroforme a été ajouté et les tubes ont été incubés à température pièce pour quelques minutes. Les tubes ont été centrifugés 15 min à $12\,000 \times g$ à 4°C . Seulement la phase aqueuse a été conservée après la centrifugation. Par la suite, un millilitre d'isopropanol a été ajouté et laissé à température pièce pendant 10 minutes. Après l'incubation à température pièce, les tubes ont été centrifugés. Les culots ont été lavés avec 1 ml d'éthanol 75 % à $7\,500 \times g$ pendant 5 minutes. Les culots ont été resuspendus dans 50-100 uL d'eau sans ARNase (Wisent, 809-115 — CL). L'ARN a été dosé à l'aide du spectromètre Nanodrop et un ratio absorbance 260/280 de plus de 1,8 a été obtenu pour tous les échantillons.

ADN complémentaire (cDNA)

Les ADN complémentaires ont été préparés pour le PCR quantitatif. La trousse de Quiagen Quantitect (Quiagen, 205 311) a été utilisée pour cette partie. La première étape consiste à éliminer l'ADN génomique résiduel après l'extraction d'ARN. Pour cette étape, le tampon gDNA a été ajouté (2ul) à 1 ug d'ARN et d'eau sans ARNase. Les échantillons ont été passés à un cycle de 2 minutes à 42°C dans l'appareil à PCR (Applied Biosystem, 9902). Ensuite, la réaction de transcription inverse a été préparée. Le tampon de transcription inverse (1ul), le Quantiscript (4ul) et les amorces (oligo dT et amorces aléatoires) de transcription inverse (1ul) ont été ajoutés à chacun des échantillons. Les échantillons ont été incubés à 42°C pendant 30 minutes, puis 3 minutes à 95°C dans l'appareil à PCR.

PCR quantitatif (qPCR)

Les ADN complémentaires ont été placés dans une plaque 96 puits (1,5 uL/puits). Les puits ont été complétés à 36 uL avec 1X du mélange contenant les sondes pour la détection de l'IL-15 (TaqMan® ms IL-15, Life Technologies Mm00434210m1 dont la molécule reportrice est le FAM™) et du gène endogène HPRT (Life Technologies Mm0154399m1 dont la molécule reportrice est le VIC®), du PCR master mix (Life technologies, 4 324 020). Le témoin positif utilisé pour cette expérience était l'ARN isolé d'une lignée de macrophages murins (J774A.1) et transcrit en ADNc. Les échantillons ont été transférés dans une plaque 384 puits en triplicatas. Les plaques de PCR quantitatif ont subi les cycles de PCR suivants (2 min à 50°C -10 min à

95 °C (15 sec 95 ° C-1 min 60 °C) pendant 40 cycles)) dans l'appareil à RT-PCR (Applied Biosystem, 4484643).

Isolement des cellules d'organes de souris

Isolement des cellules neurales et infiltrantes de souris

Les cerveaux et la moelle épinière des souris perfusées ont été recueillis et mis dans des tubes coniques contenant du milieu de culture Hibernate (Life Technologies, A12475-01). Les organes ont été coupés en morceaux à l'aide d'un scalpel et incubés à 37 °C dans une solution contenant 14ug/mL de DNase 1 (Sigma, 11 284 932 001) et 2mg/ml de collagénase D (Sigma, 11 088 866 001) pour la digestion enzymatique. Après l'incubation, les organes ont été triturés sur un filtre de 140 um (Sigma, S3895). Les filtres ont été lavés à plusieurs reprises et les échantillons ont été centrifugés 7 minutes à $421 \times g$. Les culots ont été resuspendus dans du Percoll® (GE healthcare, 17-0891-01) 37 (v/v %) et centrifugés à $500 \times g$ sans frein d'arrêt pendant 10 minutes. Après la centrifugation la myéline se trouvait sur le dessus et les cellules avaient culotées au fond du tube. La myéline a été soigneusement aspirée à la pipette et jetée avec le surnageant. Les culots ont été lavés deux fois au HBSS.

Isolement splénocytes de souris

Les rates de souris perfusées ont été récoltées et mises dans du milieu de culture RPMI enrichi de 10 % (v/v) de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent, 80 450), Pénicilline (100 U/mL), Streptomycine (100 ug/mL) (Wisent, 450201EL), et de glutamine (2 mM) (Wisent, 609065EL). Elles ont été ensuite coupées en morceaux à l'aide d'un scalpel et incubées à 37 °C dans une solution contenant 14ug/mL de DNase 1 (Sigma, 11 284 932 001) et 2mg/mL de collagénase D (Sigma, 11 088 866 001) pour la digestion enzymatique. Nous avons optimisé la digestion des organes en les digérant aussi avec des enzymes. Nous avons remarqué que nous obtenons une plus grande population de cellules présentatrice d'antigène lorsque les rates sont digérées avec ces deux enzymes avant d'être digérées mécaniquement. L'enzyme n'affecte pas l'expression des marqueurs de cytométrie. Après l'incubation, les organes ont été triturés sur un filtre de 70 um (VWR, CA21008-952). Les filtres ont été lavés à plusieurs reprises et les échantillons ont été centrifugés 7 minutes à $421 \times g$. Après la centrifugation, les culots ont été resuspendus dans

1 mL de chlorure d'ammonium 0,83 % (v/v) pendant 4 minutes à température pièce pour lyser les globules rouges. La réaction de lyse a été arrêtée en ajoutant 10 mL de milieu RPMI enrichi. Les tubes ont été centrifugés à $421 \times g$ pendant 7 minutes. Les culots ont été filtrés avec des filtres 70 μm (VWR, CA21008-952) et centrifugés à nouveau. Les culots ont été lavés avec du milieu de culture une dernière fois, puis le compte cellulaire a été fait à l'hémacymètre avec du bleu de Trypan (Wisent, 609130EL) 1,6 % (v/v).

Isolement des cellules immunes des ganglions de souris

Les nœuds lymphatiques inguinaux de souris perfusées ont été récoltés et mis dans du milieu de culture RPMI enrichi tel que décrit plus haut pour la rate. Les nœuds lymphatiques ont ensuite été coupés en morceaux à l'aide d'un scalpel et incubés à 37°C dans une solution contenant 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNase 1 (Sigma, 11 284 932 001) et 2 mg/mL de collagénase D (Sigma, 11 088 866 001) pour la digestion enzymatique. Après l'incubation les organes ont été triturés sur un filtre de 70 μm . Les filtres ont été lavés à plusieurs reprises et les échantillons ont été centrifugés 7 minutes à $421 \times g$. Les culots ont été lavés une dernière fois et recentrifugés.

Cytométrie en flux et détection des chaînes du récepteur à l'IL-15

Marquage des échantillons

Après l'isolement des différents organes récoltés, les cellules ont été transférées dans une plaque 96 puits. Les cellules ont été lavées au tampon de FACS (PBS+ 1 % (v/v) de FBS) à deux reprises à 1600 rpm pendant 6 minutes. Les cellules ont été bloquées dans une solution contenant 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rat anti CD16/CD32 (BD, 553 142), 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'immunoglobulines (Ig) normales de souris (Life Technologies, 10400C) 15 minutes à 4°C . Les mélanges d'anticorps couplés aux fluorochromes ont été mis sur la nuit à 4°C avec la solution de blocage (tableau 2).

Tableau I. Mélange d'anticorps utilisés en cytométrie en flux sur cellules de souris extraites d'organes

Anticorps	Fournisseur et numéro catalogue	Isotype	Fournisseur et numéro catalogue
CD3 Perp cy5.5	Becton Dickinson (BD), 551 163	N/A	
CD4 A700	BD, 557 956	N/A	
CD8 Pacific Blue	BD, 558 207	N/A	
CD122 PE	eBioscience, 12-1222- 82	Rat IgG2b PE	BD, 556 925
CD132 APC	Biolegend, 132308	Rat IgG 2a APC	BD, 554 690
KLRG1 BV605	BD, 564 013	Ham IgG 1 BV605	BD, 563 012
CD44 FITC	eBioscience, 11-0441- 82	Rat IgG2a A488	BD, 557 720
CD127 Pe CY7	BD, 560 733	Rat IgG 2b Pe Cy7	BD, 552 849
Live/Dead AMCYAN	Life Technologies, L34957	N/A	
NK1.1 PE Cy7	Biolegend, 108714	Rat IgG 2a Pe Cy7	BD, 552 784
TCR β FITC	BD, 553 171	Ham IgG2 FITC	BD, 553 964
TCR $\gamma\delta$ biotinylé	BD, 555 716	Ham IgG2 biot	BD, 550 084
TNF α APC	eBioscience, 17-7321- 82	Rat IgG1 A647	BD, 557 731
IFN γ -BV786	BD, 563 773	Rat IgG2a BV786	BD, 563 335
GM CSF BV421	BD, 564 747	Rat IgG2a BV421	BD, 562 602
Secondaire			
Strep BV 421	Biolegend, 405 226	N/A	

Après le marquage sur la nuit des échantillons, deux lavages au tampon de FACS ont été faits à 1600 rpm pendant 6 minutes. Le marqueur de viabilité cellulaire (LIVE/DEAD) a été incubé dans les échantillons pendant 30 minutes à 4 °C avec les anticorps secondaires s'il y en avait dans ce mélange. Après cette étape, les échantillons ont été lavés puis fixés au formaldéhyde 1 %. Nous avons utilisé des contrôles isotypiques pour tous les marqueurs d'intérêts. Pour le système nerveux central les contrôles isotypiques ont été faits pour toutes les souris parce que le marquage peut différer d'une souris à l'autre. Pour les rate le contrôle isotypique été fait que pour les rate de souris qui ont été injecté a l'IL-15 puisque ces cellules sont considérées comme plus activée.

Marquage intracellulaire

Pour la détection de cytokines (TNF, IFN γ , GM-CSF) produites par les cellules, les splénocytes ont été stimulés avec 20 ng/mL de phorbol 12 — myristate 13 — acetate (PMA) et 1ug/mL d'Ionomycine en présence de 5 ug/mL de bréfeldine A pendant 5 heures. Les cellules ont alors été marquées avec le marquage de surface sur la nuit. Le lendemain les cellules ont été perméabilisées avec 100 uL de solution de paraformaldéhyde 4 (p/v) % et de saponine 0.1 % (p/v) pendant 10 minutes à température pièce. Les cellules ont été lavées deux fois avec 150 uL de tampon saponine 0,1 % (p/v) 6 minutes à 1600 rpm. Le mélange d'anticorps pour détecter les cytokines intracellulaires a été incubé sur les cellules pendant 30 minutes. Par la suite, les cellules ont été lavées 2 fois au tampon saponine puis resuspendues dans du tampon de FACS.

Acquisition des échantillons

Les échantillons ont été passés dans un cytomètre BD LSRII ©. Les contrôles de compensation ont été faits avec des billes (eBioscience, 01-1111-42) préalablement couplées aux anticorps des mélanges de marquage. Les analyses de cytométrie ont été faites avec le programme Flow Jo © (LLC).

Billes de quantification

Lors de l'acquisition nous ajoutons les bille Sphero count XXX dans les tubes d'échantillons de SNC. Le nombre de cellules extraites après le protocole de digestion des systèmes nerveux centraux est très variable et souvent les cellules sont peut nombreuses. Nous ne comptons par les cellules au bleu de trypan pour ne pas en perdre. Nous marquons toutes les cellules extraites. Les bille non fluorescentes sont ajouté au tube avant l'acquisition et nous permet d'extrapoler le nombre de cellules qui se trouvait dans le tube au moment de l'acquisition puisque nous savons la quantité de bille que nous avons ajouté.

Injection du complexe IL-15/IL-15R α aux souris atteintes de l'EAE

Préparation

Les protéines recombinantes de souris IL-15 (R&D Systems, 447-ML-010/CF) et IL-15R α (R&D Systems, 551-MR-100) ont été diluées à 1 ug/mL dans du PBS stérile et mélangées ensemble. La solution a été incubée 30 minutes à 37 °C, puis diluée avec du PBS stérile pour obtenir 0,5 ug/100 uL d'IL-15 et 3 ug/100 uL d'IL-15 R α tel que décrit d'autres (Elpek, Rubinstein et al. 2010). Les aliquots ont été gardés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Injection chez les souris EAE

Lorsque les souris induites pour l'EAE ont atteint un score clinique de 1.0-1.5, ce qui détermine le début la maladie, les injections d'IL-15/IL-15R α ont commencées. Les souris symptomatiques ont été injectées IP avec le complexe IL-15/IL-15 R α (100ul/injection) une fois par jour pendant 8 jours. En guise de contrôle, des souris ont aussi été injectées IP avec de l'IL-15 R α seulement ou du PBS une fois par jour pendant 8 jours. Les souris ont été suivies tous les jours et euthanasiées à différents stades de la maladie.

Effet de l'IL-15 sur la détection de CD122 sur splénocytes in vitro

Suite à l'extraction des splénocytes, les cellules ont été incubées à 37 °C avec 5 ng ou 0,5 ng d'IL-15 complexé à l'IL-15 R α pendant 24 h, 48h, 72 h. Les cellules ont été marquées avec les anticorps de FACS (tableau 1) après 24 h, 48 h, 72 h d'incubation.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites avec le programme GraphPad versions 5 et 7 © (San Diego, CA). Les tests statistiques utilisés pour les courbes EAE sont les tests non paramétriques Kruskal Wallis et le test de multi comparaison Dun's. Les tests statistiques utilisés pour les analyses de qPCR et de cytométrie sont les tests paramétriques du one-way ANOVA temps et le Bonferroni.

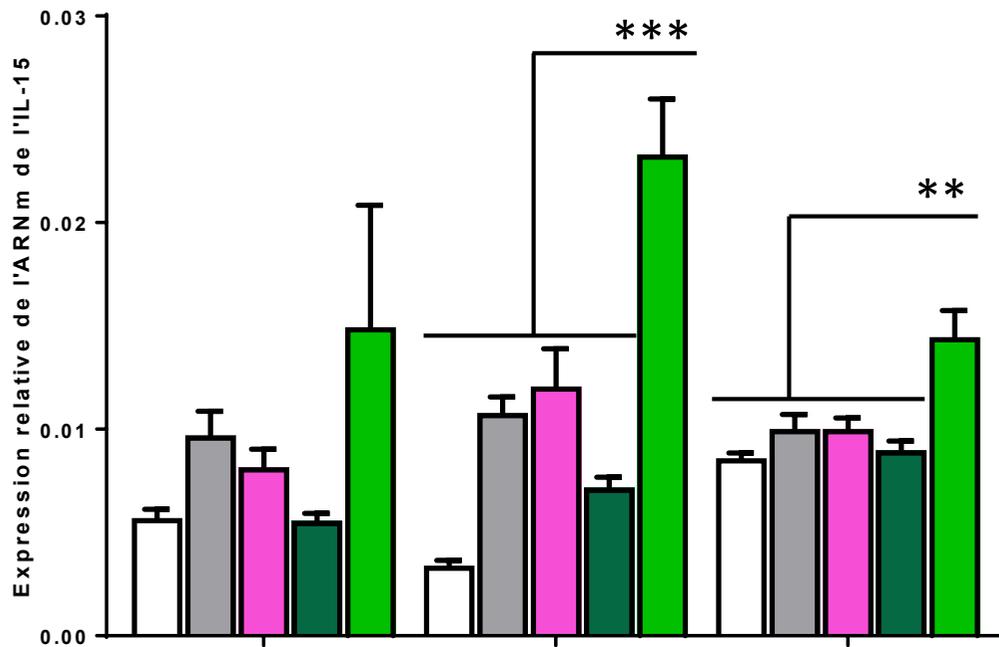
Résultats

L'ARN messager de l'IL — 15 est surexprimé au pic de la maladie EAE dans le SNC

Notre laboratoire a précédemment démontré que l'expression de l'IL-15 est plus élevée dans des leucocytes du sang périphérique (Schneider, Mohebiany et al. 2011) et dans des échantillons post-mortem de cerveau (Saikali, Antel et al. 2010) de patients atteints de la SEP en comparaison à des échantillons provenant de témoins. L'EAE représente le modèle le plus communément utilisé pour mimer plusieurs aspects de la SEP (McCarthy, Richards et al. 2012). Afin d'investiguer la variation des niveaux de l'IL-15 à différents stades de la maladie, nous avons utilisé ce modèle animal bien caractérisé. Les niveaux de l'ARN messager (ARNm) codant pour cette cytokine ont été mesurés dans plusieurs organes : le SNC et la rate, chez des souris EAE à différents stades de la maladie : pré-symptomatique, début (score clinique de 1,0-1,5) et pic (score de 3 et +). Deux contrôles négatifs ont été utilisés pour ces expériences. Les souris naïves sont des souris n'ayant reçu aucune injection. Les souris contrôles sont des souris ayant reçu le CFA et du PBS. Le but de ce dernier contrôle est de différencier l'effet de l'adjuvant (CFA) sur l'expression de l'ARNm de l'IL-15. Cinq à six souris par groupe ont été perfusées avec du PBS pour éliminer toute contamination par le sang dans les organes. Le SNC a été analysé en trois régions : la moelle épinière, le tronc cérébral+cervelet et le cerveau antérieur. Le modèle EAE utilisé (MOG35-55 chez la C57BL/6) induit une maladie neuroinflammatoire affectant particulièrement la moelle épinière et de façon moins importante le tronc cérébral et le cervelet puis beaucoup moins le cerveau antérieur. Les niveaux d'ARNm codant pour l'IL-15 ont été normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm codant pour un gène endogène (HPRT) tel que décrit dans la partie matériel et méthodes.

L'ARNm de l'IL-15 était significativement plus exprimé dans la moelle épinière (une augmentation d'environ 2 fois par rapport au contrôle adjuvant seulement) et le tronc cérébral+cervelet des souris EAE au pic de la maladie (figure 3a) en comparaison aux mêmes organes prélevés de souris contrôles ou à des stades précoces de la maladie (présymptomatique et début). La rate a servi d'organe contrôle (figure 3 b) ; l'ARNm de l'IL-15 n'a pas changé selon les différents stades de la maladie pour cet organe. Ces résultats suggèrent que l'expression d'IL-15 est augmentée dans l'organe principalement touché par l'EAE (la moelle épinière et le tronc cérébral/cervelet) particulièrement au pic de la maladie.

A)



B)

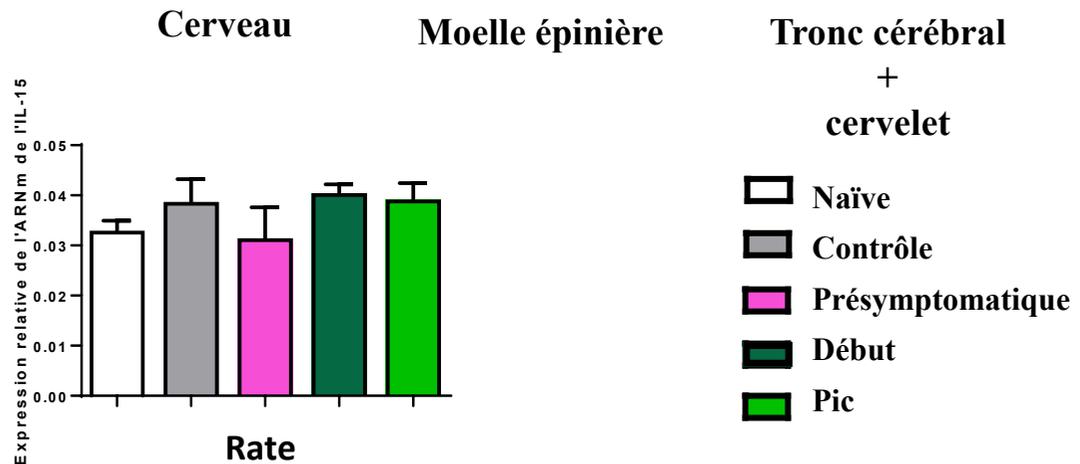


Figure 3: L'ARNm codant pour l'IL-15 est surexprimé dans la moelle épinière au pic de l'EAE

Les organes de souris EAE aux différents stades de la maladie: présymptomatique, début (score 1,0-1,5) et pic (score 3,0 et plus) ont été analysés pour l'expression d'ARNm codant pour l'IL-15. Les souris contrôles ont été injectées avec l'adjuvant complet de Freund contenant du PBS. Les souris naïves n'ont rien reçu. L'expression relative représente l'expression de l'ARN codant pour l'IL-15 comparée à celle d'un gène endogène (HPRT); les résultats de 5 à 6 souris par groupe sont présentés. A. L'expression relative de l'ARNm de l'IL-15 dans les différentes régions du système nerveux central aux différents stades de la maladie. B. L'expression relative de l'ARNm de l'IL-15 dans la rate. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ "one-way ANOVA" et Bonferroni post-test.

Les injections d'IL-15 provoquent une EAE plus sévère

Certaines études effectuées sur des souris déficientes pour l'IL-15 semblent montrer un effet protecteur de cette cytokine sur la pathogenèse du modèle EAE (Wu, Pan et al. 2010, Pandiyan, Yang et al. 2012). Toutefois, tel que mentionné dans l'introduction, le système immunitaire des souris déficientes pour cette cytokine démontre des altérations importantes qui pourraient contribuer à la diminution des scores cliniques de l'EAE chez ces souris en comparaison à des souris sauvages (Marks-Konczalik, Dubois et al. 2000, Ranson, Vosshenrich et al. 2003). Étant donné que notre groupe a déjà établi que l'expression de l'IL-15 est plus élevée en périphérie chez les patients atteints de la SEP en comparaison à des témoins sains (Schneider, Mohebiany et al. 2011) ; nous avons voulu vérifier si cette cytokine contribue à moduler la maladie après son déclenchement. Une telle observation pourrait être utile à des fins d'interventions thérapeutiques.

Afin de caractériser l'effet périphérique de l'IL-15 sur le développement de l'EAE, les conséquences des injections périphériques d'IL-15 sur la pathogenèse de l'EAE après son déclenchement ont été évaluées. Étant donné les données obtenues par notre groupe sur des échantillons humains, nous avons émis l'hypothèse que des niveaux élevés d'IL-15 en périphérie contribuent à augmenter la neuropathologie de l'EAE. Les souris ont été soumises à un protocole d'EAE moins sévère que le protocole employé de routine dans le laboratoire ; un tiers de la dose habituelle du peptide MOG 35-55 a été utilisée. Le but de cette modification était de causer une maladie moins sévère afin de pouvoir observer une augmentation de la sévérité de la maladie induite par l'IL-15 et ainsi éviter que les souris injectées avec l'IL-15 soient tellement malades qu'elles atteignent trop rapidement les points limites établis par le comité de protection des animaux.

Lorsque les souris atteignaient un score clinique de 1 à 2 elles ont reçu une injection IP quotidienne pendant 8 jours d'IL-15 complexée à son récepteur alpha (IL-15R α). Le complexe a été injecté aux souris, car c'est la forme physiologique de la cytokine la plus souvent retrouvée *in vivo*. Les doses choisies ont été les mêmes que celles utilisées par d'autres groupes dans d'autres modèles animaux (Elpek, Rubinstein et al. 2010). Les injections ont été faites après le début de la maladie, car c'est ce qui est le plus représentatif des quantités d'IL-15 mesurées dans

le sang des patients SEP. L'expérience a été contrôlée avec des injections d'IL-15 R α non couplé à la cytokine et des injections de PBS.

Les résultats présentés à la Figure 2 ont été compilés à partir de trois expériences indépendantes. Pour chacune des expériences indépendantes, de cinq à sept souris par groupe ont été traitées ; au total les résultats de 16 à 22 souris par groupe sont présentés (Figure 4). Les souris ont été suivies quotidiennement pour vingt jours après la dernière injection d'IL-15 complexée afin d'investiguer l'impact à long terme des doses élevées de cytokine. Les injections d'IL-15 complexée ont causé un développement significativement plus sévère de l'EAE comparativement aux deux groupes contrôles (Figure 4). Cette différence est notée par un score clinique plus sévère observé quelques jours après l'arrêt des injections, mais qui s'est stabilisé pendant le reste de la maladie. Non seulement les souris injectées à l'IL-15 complexée avaient un score clinique plus élevé, mais leur état général était diminué et elles avaient une perte de poids plus importante. Certaines souris ont dû être euthanasiées malgré des soins palliatifs (des injections biquotidiennes de saline pour maintenir l'hydratation des souris, l'accès à de l'eau en format de bouteille adaptée, l'accès à de la nourriture humide et enrichie) avant la fin de l'expérience à cause de l'atteinte d'un point-limite ou de paralysie complète (score de 5). Les analyses statistiques des scores cliniques ont été effectuées selon les recommandations publiées (Fleming, Bovaird et al. 2005). Afin de tenir compte du fait que les scores cliniques représentent des données non-paramétriques, les comparaisons entre les groupes ont été faites à partir d'un test statistique Kruskal Wallis. Deux types d'analyses ont été effectués en tenant compte de la disparition de certaines souris en cours d'expériences pour les raisons mentionnées ci-haut. Le graphique sur la Figure 4a montre les scores cliniques de toutes les souris, et ce jusqu'à la fin de l'expérience. Le score clinique des souris euthanasiées a été inclus dans cette analyse ; le score clinique le jour de l'euthanasie a été reporté jusqu'au jour 28 post-injection du complexe IL-15. Comme il est difficile de prévoir le score de ces souris après leur mort, une deuxième analyse a été effectuée en n'incluant que les scores cliniques des souris vivantes ; les scores des souris euthanasiées ont été arrêtés après la mort des animaux (Figure 4 b). Cette deuxième analyse montre une rémission artificielle des souris du groupe injecté à l'IL-15 complexée causée par une diminution du nombre de souris vers la fin de l'expérience. Toutefois, dans les deux cas, les résultats montrent que l'EAE était significativement plus sévère pour le groupe traité au complexe IL-15 comparée aux groupes contrôles quelques jours après l'arrêt des

injections. Ces résultats suggèrent donc que des niveaux périphériques élevés de cette cytokine jouent un rôle délétère dans la neuropathobiologie, telle que mesurée par les symptômes cliniques, du modèle EAE.

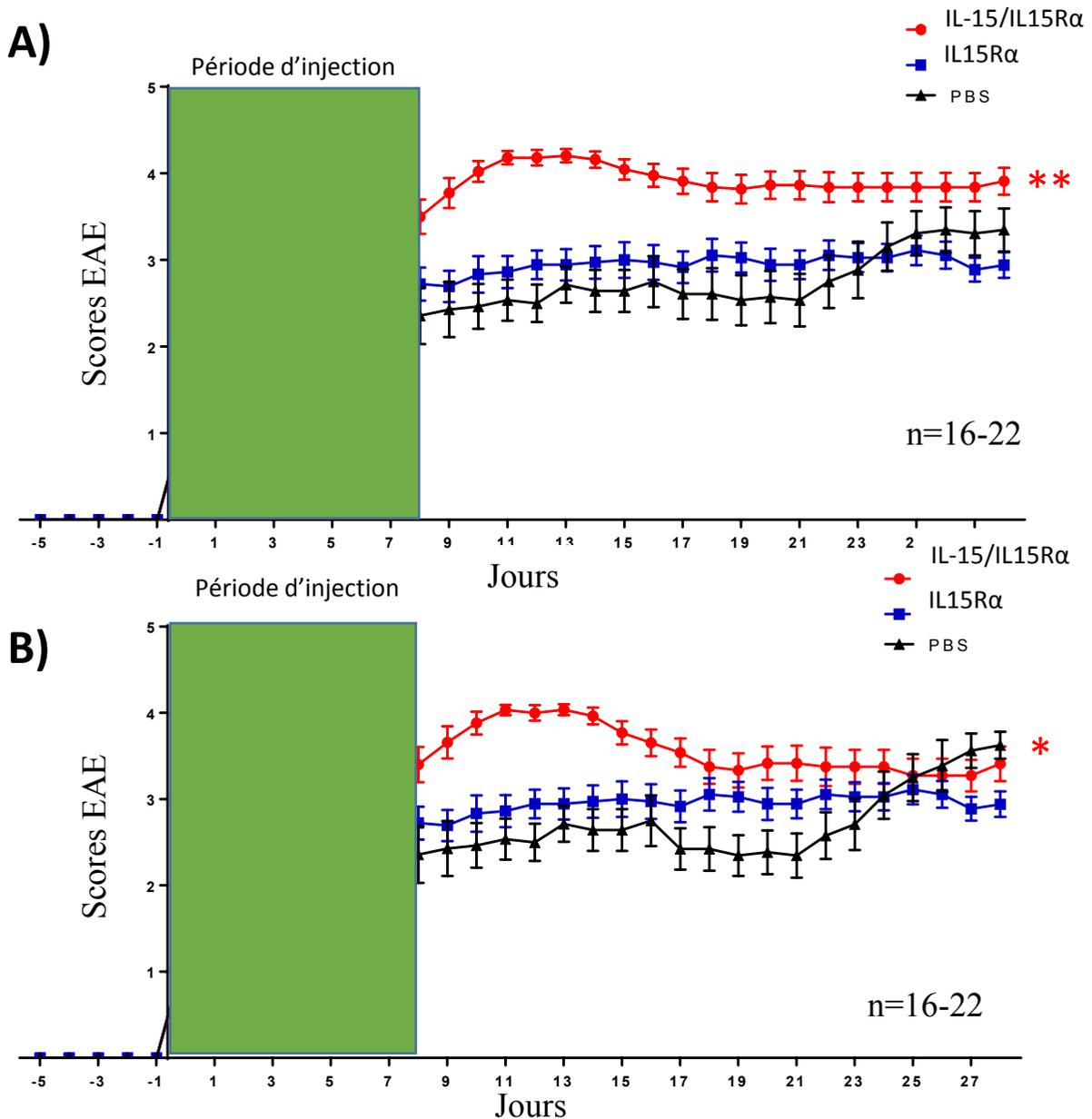


Figure 4: L'injection du complexe IL-15/IL15Rα après le début des symptômes augmente la sévérité de l'EAE

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15Rα ou un des contrôles (IL-15Rα seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Le poids et le score des souris ont été évalués quotidiennement jusqu'à 20 jours après la dernière injection. Certaines souris ont dûes être euthanasiées avant la fin de l'expérience lorsqu'elles atteignaient un des points limites. A. Score clinique quotidien de toutes les souris; les scores des souris euthanasiées en cours d'expérience ont a été conservées pour l'analyse statistique. B. Score clinique quotidien de toutes les souris; les scores des souris euthanasiées en cours d'expérience ont a été enlevées des données à partir du jour de leur décès. n= 14-20 au jour 9, n=13-17 au jour 14, n=11-17 au jour 25 Kruskal Wallis, analyse Dunn's post-test complexe IL-15/IL-15Rα vs. IL-15Rα ou PBS * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Les injections d'IL-15 semblent avoir un effet sur les populations de cellules immunitaires infiltrant le SNC

L'IL-15 joue un rôle important dans la prolifération et le maintien des lymphocytes T CD8 et des cellules NK. Afin d'évaluer si les injections d'IL-15 complexée ont eu un impact sur les populations leucocytaires tant au niveau de la fréquence que du nombre absolu, des analyses phénotypiques par cytométrie en flux ont été réalisées sur le SNC et sur la rate comme organe contrôle. Afin d'évaluer l'impact de l'IL-15 sur les lymphocytes au sein de ces organes, deux moments distincts ont été sélectionnés : le jour 9 soit 24 heures après la dernière injection d'IL-15 complexée et le jour 13-15 au pic de la maladie. Les souris ont été perfusées avec du PBS pour éliminer toute contamination par le sang dans les organes. La figure 3 représente la stratégie d'analyse des différentes populations de cellules immunitaires ayant infiltrées le SNC. Le pourcentage et le nombre absolu de cellules par SNC ont été analysés pour les différents groupes (IL-15/IL-15R α , IL-15R α et PBS). Le nombre absolu de cellules par SNC a été extrapolé à l'aide de billes de quantification non fluorescentes pour la cytométrie. Les doublets et les cellules mortes ont été enlevés des analyses. Le marqueur CD3 a été utilisé pour identifier les lymphocytes T dans le SNC. Les différents types de TCR (TCR β et TCR $\gamma\delta$) ont été évalués parmi les cellules CD3 $^+$. Par la suite, les lymphocytes T CD3 ont été subdivisés en lymphocytes T CD4 et CD8. Le marqueur NK1.1 a été utilisé pour identifier les cellules NK (CD3 $^{\text{neg}}$ NK1.1 $^+$) (Figure 5). Tel qu'attendu, la majorité des lymphocytes T CD3 $^+$ ayant infiltré le SNC exprimaient le TCR β et parmi celles-ci, une plus grande proportion était des lymphocytes T CD4 $^+$ et une plus petite population de lymphocytes T CD8 $^+$ était présente.

Les résultats de 3 à 4 souris par groupe et par moment choisi ont été analysés et sont présentés à la Figure 4. Les pourcentages et les nombres absolus des lymphocytes T CD3 $^+$ totaux, des lymphocytes T TCR β $^+$ ou TCR $\gamma\delta$ $^+$ ont été très similaires entre les groupes de souris ayant reçu l'IL-15 complexé ou les contrôles (IL-15R α ou PBS) pour les deux temps d'analyse choisis (jour 9 et jour 13-15) (figure 6A). Les pourcentages et les nombres absolus de lymphocytes T CD4 ou CD8 ont aussi été très similaires entre les trois groupes (figure 6 B et C). Le nombre absolu de lymphocytes T CD4 et CD8 ayant infiltré le SNC semblent être légèrement plus élevé dans le groupe de souris traitées à l'IL-15 complexée au jour pic de la maladie que les autres groupes contrôles, mais des souris supplémentaires devront être

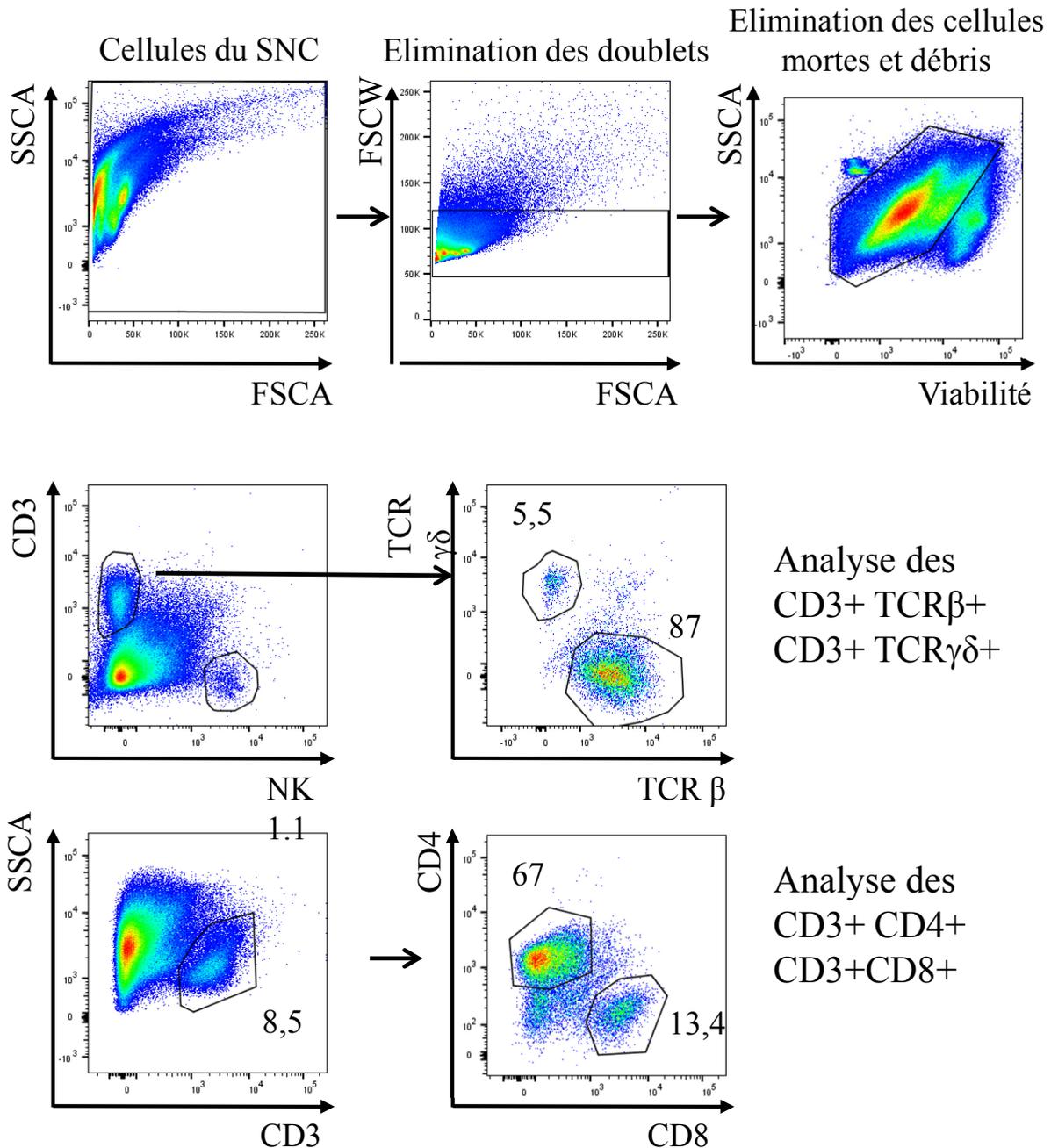


Figure 5 : Stratégie d'analyse de cytométrie pour le SNC

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15 α ou un des contrôles (IL-15 α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) et au jour 15 (pic de la maladie). Le SNC (cerveau et la moelle épinière) a été récupéré pour les analyses de cytométrie. Les cellules ont été marquées pour la détection CD3, CD4, CD8, NK1.1, TCR β et TCR $\gamma\delta$.

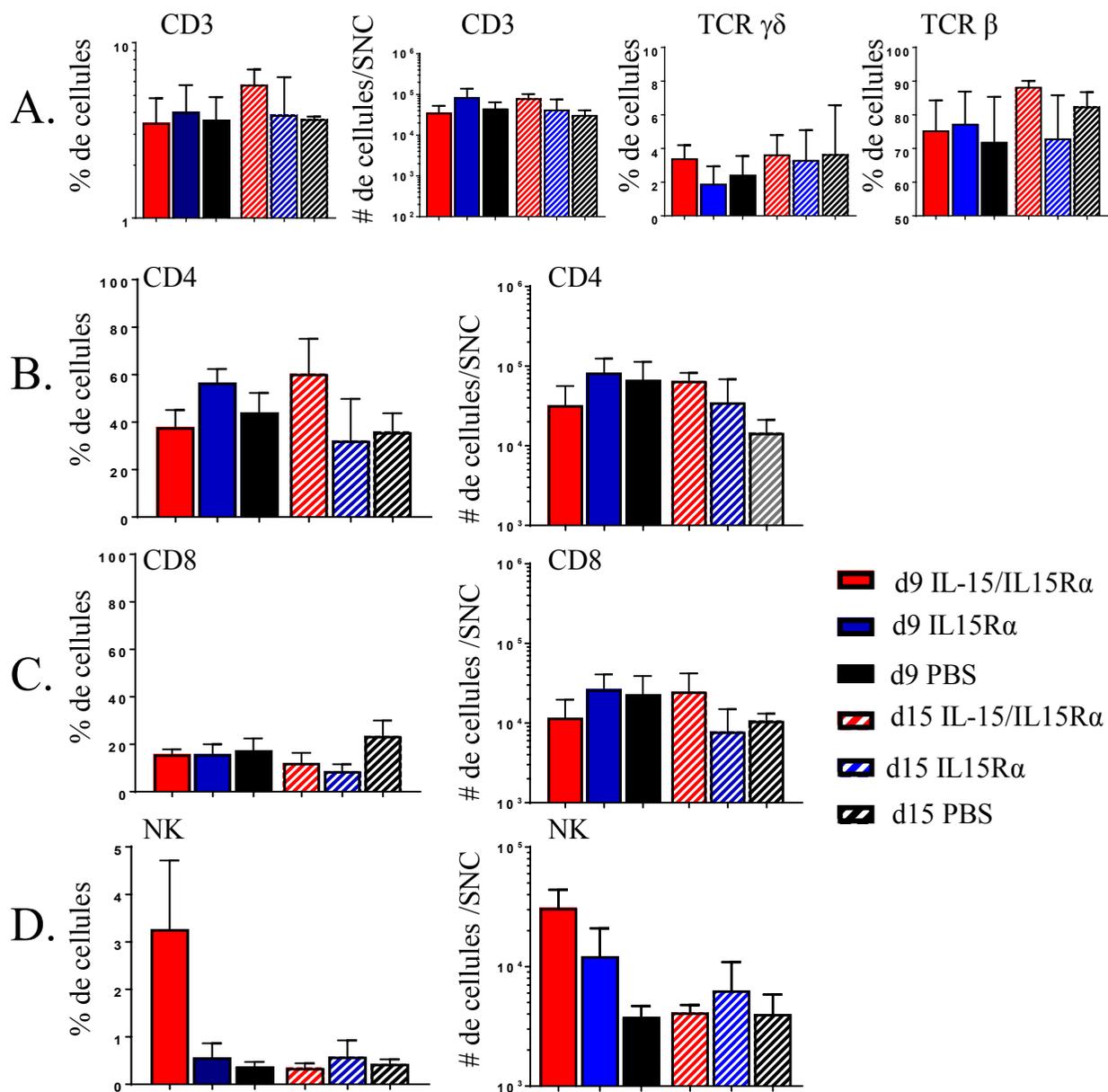


Figure 6 : Les souris injectées à l'IL-15 tendent à avoir plus de cellules NK dans le SNC

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15Rα ou un des contrôles (IL-15Rα seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées au jour 9 (24h post-injection) et au jour 15 (pic de la maladie). Les souris ont été perfusées au PBS puis les organes ont été récupérés pour les analyses de cytométrie. Les cellules du SNC ont été marquées pour la détection de CD3, CD4, CD8, NK 1.1, TCR γδ, TCRβ. A. Graphiques illustrant le pourcentage (%) et le nombre (#) de cellules T CD3 et les types de TCR dans le SNC. B.C.D Graphiques illustrant le % et le # de CD4, CD8 et NK dans le SNC. n= 3-4 par groupe

analysées afin de confirmer cette tendance ($p \geq 0.05$) (figure 6 B et C). Par contre, il semble y avoir une tendance plus marquée à l'augmentation de la fréquence ($p=0.07$) et du nombre ($p=0.08$) de cellules NK (CD3neg NK1.1) qui ont infiltré le SNC 24 heures après l'arrêt des injections d'IL-15 complexée (figure 6 D). Cet effet n'a pas perduré au pic de la maladie puisque la fréquence et le nombre de cellules NK semblent être similaires aux contrôles pour les souris injectées à l'IL-15. Ces résultats suggèrent que l'augmentation des niveaux d'IL-15 en périphérie peut transitoirement provoquer une plus grande migration des cellules NK dans le SNC.

Les injections d'IL-15 n'affectent pas les populations cellulaires susceptibles de répondre à cette cytokine dans le SNC

Le but de ces expériences était d'évaluer si l'exposition à des hautes doses d'IL-15 complexée en périphérie affectait l'expression des récepteurs spécifiques à l'IL-15, aussi partagés avec l'IL-2, des populations lymphocytaires ayant infiltré le SNC. Une telle diminution d'expression pourrait rendre les cellules moins susceptibles à ces cytokines potentiellement présentes dans le SNC. Les populations cellulaires étudiées ont été les lymphocytes T CD4 et CD8 et les cellules NK. Pour identifier les cellules susceptibles de répondre à l'IL-15, le marqueur CD122 a été utilisé (Figure 7a). Ce marqueur correspond à la chaîne β du récepteur à l'IL-15 et n'est partagé qu'avec l'IL-2. L'expression de la chaîne CD132 qui correspond à la chaîne commune à plusieurs récepteurs de cytokine a aussi été évaluée. Toutefois, les outils de détection disponibles pour une telle détection semblent sous-évaluer les niveaux de CD132. Les pourcentages de cellules qui exprimaient le CD122 (en présence ou en absence de CD132) ont donc été compilés pour chacune des populations (Figure 7). La stratégie d'analyse de cytométrie est illustrée sur la Figure 7A alors que les données compilées pour 3 ou 4 souris par groupes sont présentées dans la Figure 7 B. Les fréquences de lymphocytes T CD4 et CD8 ayant infiltré le SNC et qui exprimaient le CD122 étaient similaires entre les différents groupes (Figure 7B). Cependant, il y a une tendance ($p=0.0959$, IL-15 complexée vs. IL-15R α) à l'augmentation pour la fréquence des cellules NK ayant infiltré le SNC et qui exprimaient le CD122 chez les souris injectées à l'IL-15 complexée au jour 9 et au pic de la maladie (Figure 7 C). Par la suite, l'intensité moyenne de fluorescence du récepteur CD122 sur les cellules immunitaires a été analysée. Il y a une tendance seulement pour les lymphocytes T CD8 à une augmentation de la

quantité de récepteur exprimé à la surface cellulaire pour les souris injectées avec l'IL-15 complexée par rapport aux groupes contrôles (Figure 7B). Ces résultats suggèrent que même si le pourcentage de lymphocytes T CD8 exprimant le CD122 au sein du SNC n'augmentait pas à la suite des injections d'IL-15 complexée, les lymphocytes T CD8 semblaient exprimer des niveaux plus élevés de la chaîne CD122 ; il est possible qu'une telle augmentation contribue à rendre ces lymphocytes plus réceptifs à l'IL-15. Dans le cas des cellules NK, une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD122 a été observée dans le groupe de souris ayant reçu les injections d'IL-15 complexée ; cette différence n'a toutefois pas atteint une valeur statistiquement valide. Les niveaux de CD122 étaient similaires entre les différents groupes de souris. Nos résultats suggèrent que le pourcentage de cellules NK potentiellement susceptibles de répondre à l'IL-15 été augmenté suite aux injections à l'IL-15 complexée. Il faut noter que les cellules NK exprimaient des niveaux nettement supérieurs de CD122 comparativement à ceux observés chez les lymphocytes T CD4 et CD8 (Figure 7 B).

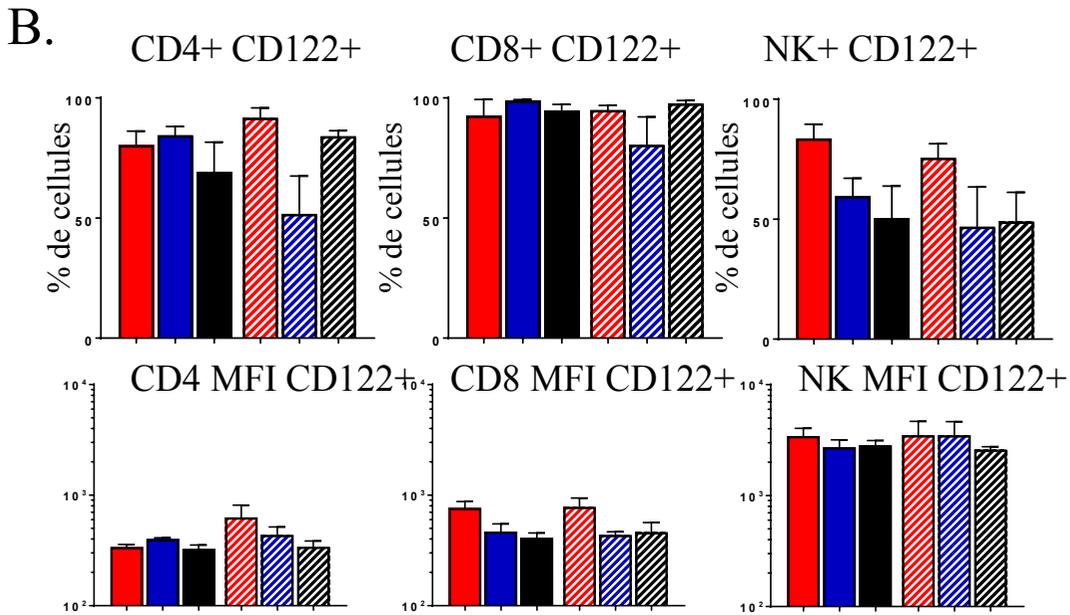
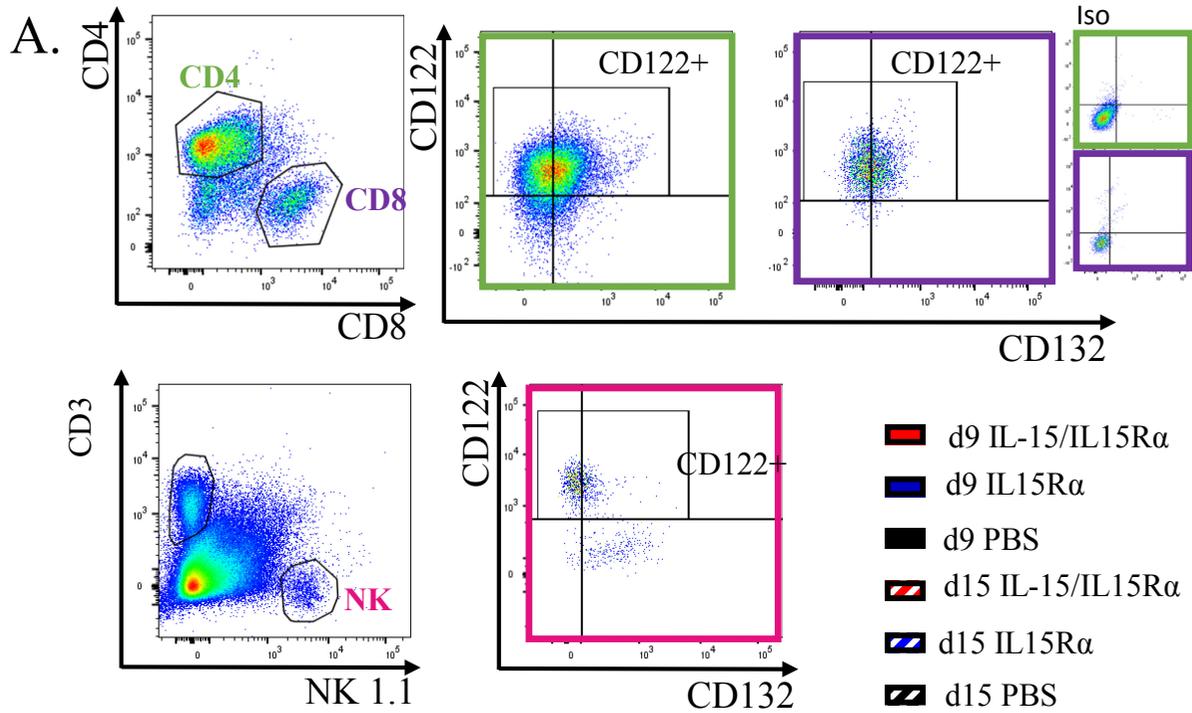


Figure 7: Les injections d'IL-15 n'affectent pas les populations de cellules immunitaires positives pour le récepteur CD122 dans le SNC

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post-injection) ou au jour 15 (pic de la maladie). Le SNC a été récupéré pour les analyses de cytométrie. A. Nuages de points illustrant la stratégie d'analyse de cytométrie. B. Graphiques représentant la quantification des cellules CD4, CD8, NK positives pour CD122 ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence. n=3-4 par groupe

Les injections d'IL-15 diminuent les fréquences des lymphocytes T CD4 effectrices précoces (EEC) parmi les leucocytes qui infiltrent le SNC

Le marqueur CD44 est une glycoprotéine impliquée dans l'adhérence cellulaire ; l'expression de CD44 augmente sur les cellules T activées (Kennel, Lankford et al. 1993). Presque tous les lymphocytes T qui ont infiltré le SNC au cours de l'EAE sont majoritairement déjà activés, car ils proviennent de la périphérie où il y a eu activation et reconnaissance de l'antigène (MOG dans le cas de l'EAE). C'est pour cette raison que la majorité de ces cellules (≥ 90 %) est positive dans le SNC pour ce marqueur (Figure 8A). Dans des modèles d'infections virales de nombreux groupes utilisent les marqueurs KLRG1 et CD127 afin de caractériser les différents phénotypes des lymphocytes T CD4 et CD8 (Obar, Jellison et al. 2011). Le KLRG1, une lectine, est utilisé comme marqueur de différenciation cellulaire (Sarkar, Kalia et al. 2008). Le CD127 correspond au récepteur de l'IL-7 et est impliqué dans la prolifération homéostatique des lymphocytes T. Dans des modèles d'infections virales, les lymphocytes T KLRG1+ CD127- sont des cellules effectrices de courte longévité (SLEC), les cellules KLRG1+ CD127+ sont des cellules effectrices doubles positives (DPEC) et les cellules KLRG1- CD127- sont des cellules effectrices précoces (EEC) (Obar, Jellison et al. 2011). Finalement les cellules KLRG1- CD127+ correspondent aux précurseurs de cellules mémoires (MPEC) (Obar, Jellison et al. 2011).

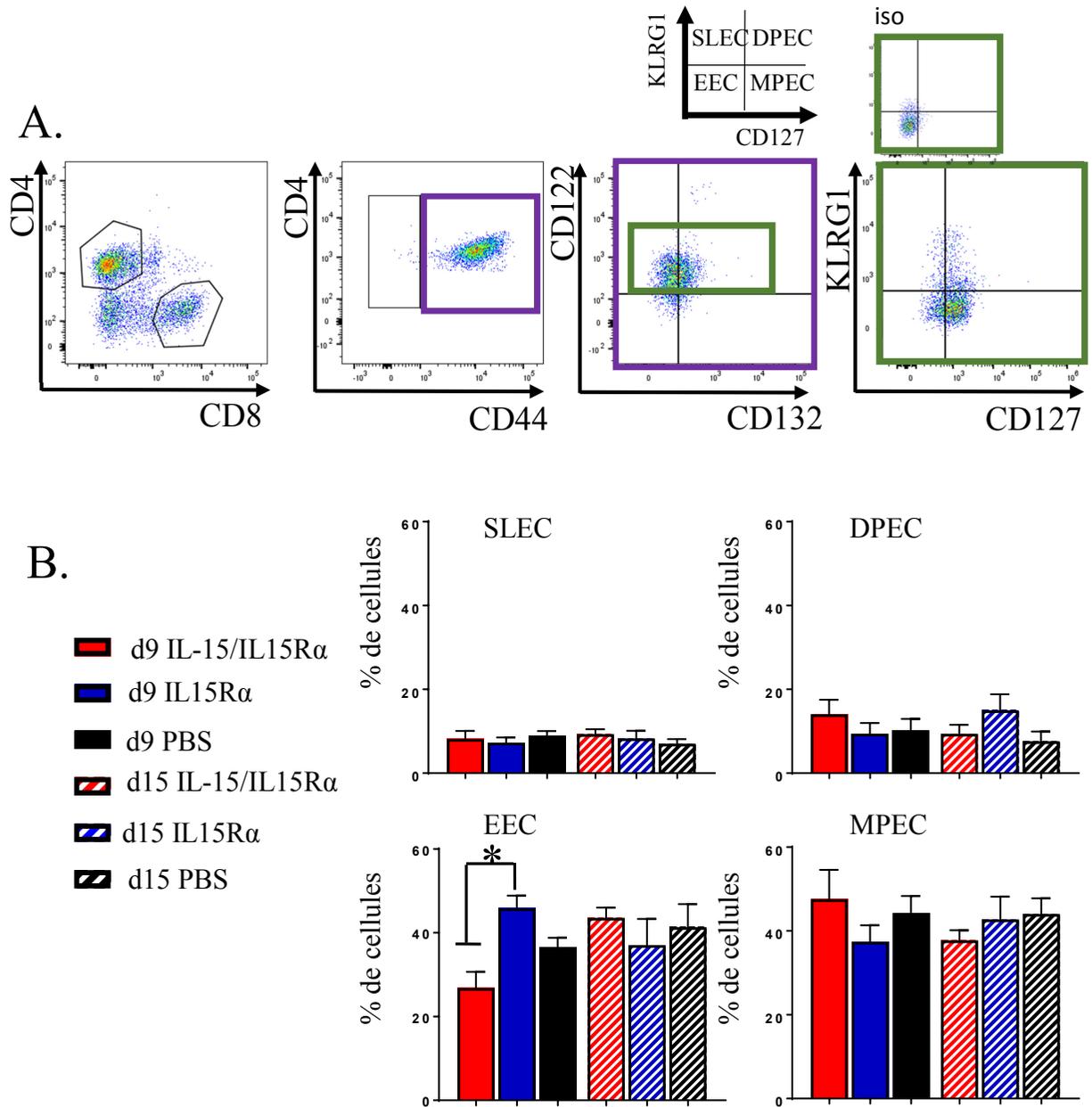


Figure 8 : Les injections d'IL-15 diminuent la proportion de cellules effectrices précoces (EEC) chez les cellules T CD4 infiltrant le SNC

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) ou au jour 15 (pic de la maladie). Le SNC a été récupéré pour les analyses de cytométrie. A. Nuages de points représentant la stratégie d'analyse de cytométrie. B. Graphiques illustrant la quantification du phénotype des lymphocytes T CD4 infiltrant le SNC. SLEC: Cellules effectrices de courte durée DEPC: cellules effectrices doubles positives EEC: Cellules effectrices précoces MPEC: Précurseurs de cellules mémoires. n= 3-4 par groupe "one-way ANOVA", Bonferroni post test * $p \leq 0,05$

Ces marqueurs cellulaires ont été utilisés dans le but de caractériser les lymphocytes T qui infiltrent le SNC des souris EAE et qui expriment la chaîne CD122.

Les cellules T CD4 activées (CD44+) qui expriment CD122 ont été caractérisées selon l'expression des marqueurs KLRG1 et CD127 (Figure 8a). Une grande proportion des lymphocytes T CD4 au sein du SNC qui exprimaient la chaîne CD122 (42,33 %) exprimait les marqueurs de MPEC. Les lymphocytes T CD4 démontrant les caractéristiques phénotypiques des cellules EEC représentaient la deuxième population en importance (36,95 %) des lymphocytes T CD4 CD122+. Les populations DPEC (11,9 %) et SLEC (8,54 %) représentaient des plus petites proportions de lymphocytes T CD4 CD122+ (Figure 8B).

Suite aux injections d'IL-15 complexée, il y a eu une diminution significative du pourcentage de cellules EEC chez les lymphocytes T CD4 CD122+ qui ont infiltré le SNC (Figure 8 B) au jour 9, mais pas au pic de la maladie (J13-15) ; ces données suggèrent que la cytokine a induit une modulation transitoire des populations de lymphocytes T CD4. Les autres phénotypes cellulaires n'ont pas été modifiés de façon significative ($p \geq 0.1$) ; le pourcentage de cellules MPEC parmi les lymphocytes T CD4+ CD122+ avait légèrement augmenté dans le SNC au jour 9 sans atteindre de différence statistiquement valide.

L'augmentation de l'IL-15 n'a pas d'effet sur le phénotype de lymphocytes T CD8 qui infiltrent le SNC

La même analyse pour les lymphocytes T CD4 a été appliquée pour les lymphocytes T CD8 (Figure 9a). De façon similaire aux cellules T CD4+, les lymphocytes T CD8+ ayant infiltré le SNC sont très majoritairement CD44+. Les lymphocytes T CD8 susceptibles de répondre à l'IL-15, donc exprimant le CD122 ont été caractérisés à l'aide des marqueurs KLRG1 et CD127. La plus grande prévalence des populations EEC (37,48 %) et MPEC (43,73 %) parmi les lymphocytes T CD8 CD122+ ayant infiltrés le SNC était aussi observée (Figure 9b). Les populations SLEC (7,1 %) et DPEC (11,65 %) étaient détectables, mais à des niveaux beaucoup plus faibles et ce de façon similaire aux lymphocytes T CD4. Dans le cas des lymphocytes T CD8, l'injection d'IL-15 complexée en périphérie n'a pas affecté de façon significative leur phénotype ($p \geq 0.1$) dans le SNC (Figure 9 b). Toutefois, on peut souligner qu'une tendance pour une diminution des proportions de cellules SLEC et DPEC au bénéfice d'une augmentation de

la population EEC et MPEC semblait être visible (Figure 9 B) entre le groupe ayant reçu de l'IL-15 complexée et les groupes contrôles.

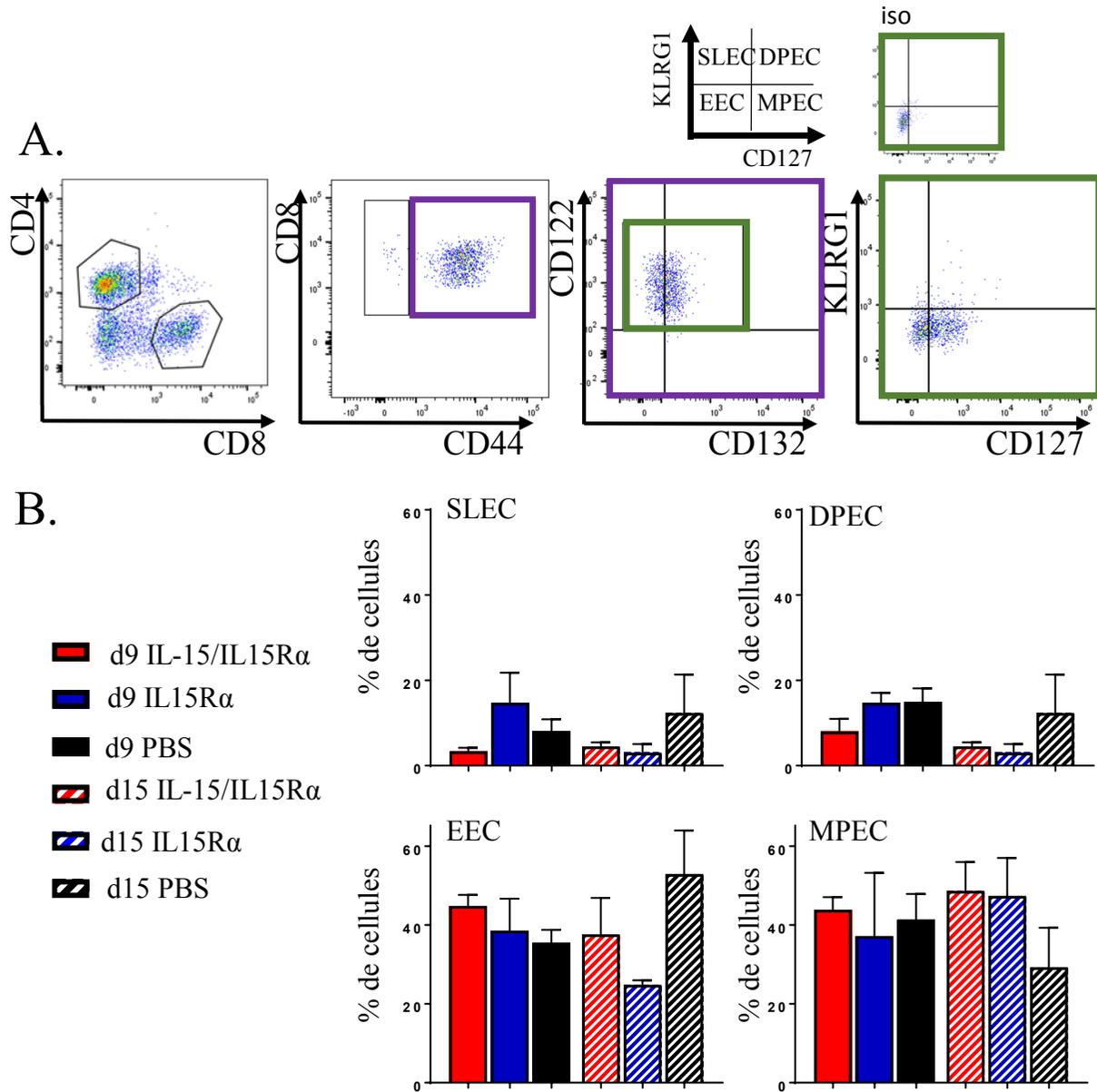


Figure 9: Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des cellules T CD8 infiltrant le SNC

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) ou au jour 15 (pic de la maladie). Le SNC a été récupéré pour les analyses de cytométrie. A. Nuages de points représentant la stratégie d'analyse de cytométrie. B. Graphiques illustrant la quantification du phénotype des lymphocytes T CD8 infiltrant le SNC. SLEC: Cellules effectrices de courte longévité DEPC: Cellules effectrices doubles positives EEC: Cellule effectrices précoces MPEC: Précurseurs de cellules mémoires. n=3-4 par groupe

Les souris injectées à l'IL-15 ont plus de lymphocytes T CD8 et de cellules NK en périphérie

Étant donné que la voie d'administration augmentait les niveaux d'IL-15 en périphérie, la rate des souris a également été récupérée en même temps que le SNC pour évaluer l'effet des injections sur les populations cellulaires spléniques. Lors de la récolte des organes, les rates des souris injectées à l'IL-15 complexées semblaient plus grosses que celles injectées avec l'un des contrôles 24 h après l'arrêt des injections. En effet, le nombre de splénocytes totaux obtenus au jour 9 pour le groupe de souris ayant reçu de l'IL-15 complexée était nettement plus élevé ($97 \times 10^6 \pm 10.2 \times 10^6$) que le groupe ayant reçu de l'IL-15R α ($54 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^6$) ou du PBS ($78 \times 10^6 \pm 17 \times 10^6$). Toutefois, au pic de la maladie au J13-15 ; le nombre de splénocytes totaux était similaire entre les différents groupes contrôles et moindre pour le groupe injecté à l'IL-15 ; $39 \times 10^6 \pm 7.4 \times 10^6$ splénocytes pour les souris injectées à l'IL-15 complexée et $64 \times 10^6 \pm 14 \times 10^6$ pour le groupe ayant reçu de l'IL-15R α et $69 \times 10^6 \pm 15 \times 10^6$ pour le groupe PBS .

Les cellules de la rate ont été marquées afin de détecter les lymphocytes T CD3, les différents types de TCR (TCR β et TCR $\gamma\delta$) ainsi que les sous-populations de lymphocytes T CD4 et CD8 et les cellules NK (Figure 10). Par la suite, le nombre de cellules par rate ainsi que le pourcentage des populations de cellules immunitaires ont été analysés. Le pourcentage de lymphocytes T CD3 parmi les splénocytes était augmenté chez les souris ayant reçu l'IL-15 complexée ; cette augmentation était presque significative au niveau statistique au J9 ($p=0.0733$). Le nombre absolu de lymphocytes T CD3+ par rate était significativement augmenté dans la rate des souris ayant reçu l'IL-15 complexée au jour 9 par rapport à tous les autres groupes (Figure 11A). Toutefois, au pic de la maladie, soit 4 à 6 jours après la dernière injection, le nombre de splénocytes était similaire pour les trois groupes de souris (Figure 11A). La très grande majorité des lymphocytes T CD3 exprimaient les chaînes du TCR α/β et une petite proportion (moins de 4 %) exprimaient les chaînes du TCR γ/δ (Figure 11 A ; ces proportions étaient similaires entre tous les groupes.

Parmi les lymphocytes T CD3+, le pourcentage de lymphocytes T CD4 a diminué de façon significative dans le groupe de souris ayant reçu de l'IL-15 complexé par rapport aux deux groupes contrôles et ce aux deux moments d'analyse (d99 et d15 au pic de la maladie). Toutefois, le nombre absolu de lymphocytes T CD4 par rate était très similaire entre les trois

groupes étudiés. Ceci suggère que ces cellules ne meurent pas en réponse à l'IL-15, mais qu'elles étaient en moins grande proportion au sein de la rate suite aux injections d'IL-15 complexée (figure 11 b). En réponse à l'IL-15, la proportion et le nombre absolu de lymphocytes T CD8 étaient augmentés de façon significative 24h après la fin des injections (Figure 11 C). Le pourcentage de lymphocytes T CD8 parmi les lymphocytes T de la rate était encore légèrement augmenté pour les au jour 15 sans atteindre une différence significative par rapport aux autres groupes (Figure 11 C).

Le pourcentage de cellules NK a aussi augmenté de façon significative parmi les splénocytes au Jour 9, soit 24 après la dernière injection, pour les souris ayant reçu l'IL-15 complexée par rapport aux groupes témoins (Figure 11 D). Toutefois, le pourcentage de ces cellules au sein des rates recueillies au J15 était similaire pour tous les groupes (Figure 11 D). Le nombre absolu de cellules NK au J9 a aussi été augmenté pour le groupe ayant reçu l'IL-15 complexée par rapport aux autres groupes sans toutefois atteindre une significativité statistique (Figure 11 D). Les valeurs de nombre absolu de cellules NK parmi les splénocytes étaient similaires pour les trois groupes.

Ces résultats suggèrent que les injections du complexe IL-15 ont eu un effet sur certaines populations de cellules immunitaires (augmentation du nombre de lymphocytes T et de cellules NK), mais que cet effet était de courte durée (quelques jours). Ceci suggère que les lymphocytes T CD8 et les cellules NK ont besoin d'un apport constant d'IL-15 pour proliférer. La prolifération des lymphocytes T CD4 ne semblait pas être affectée par les injections d'IL-15.

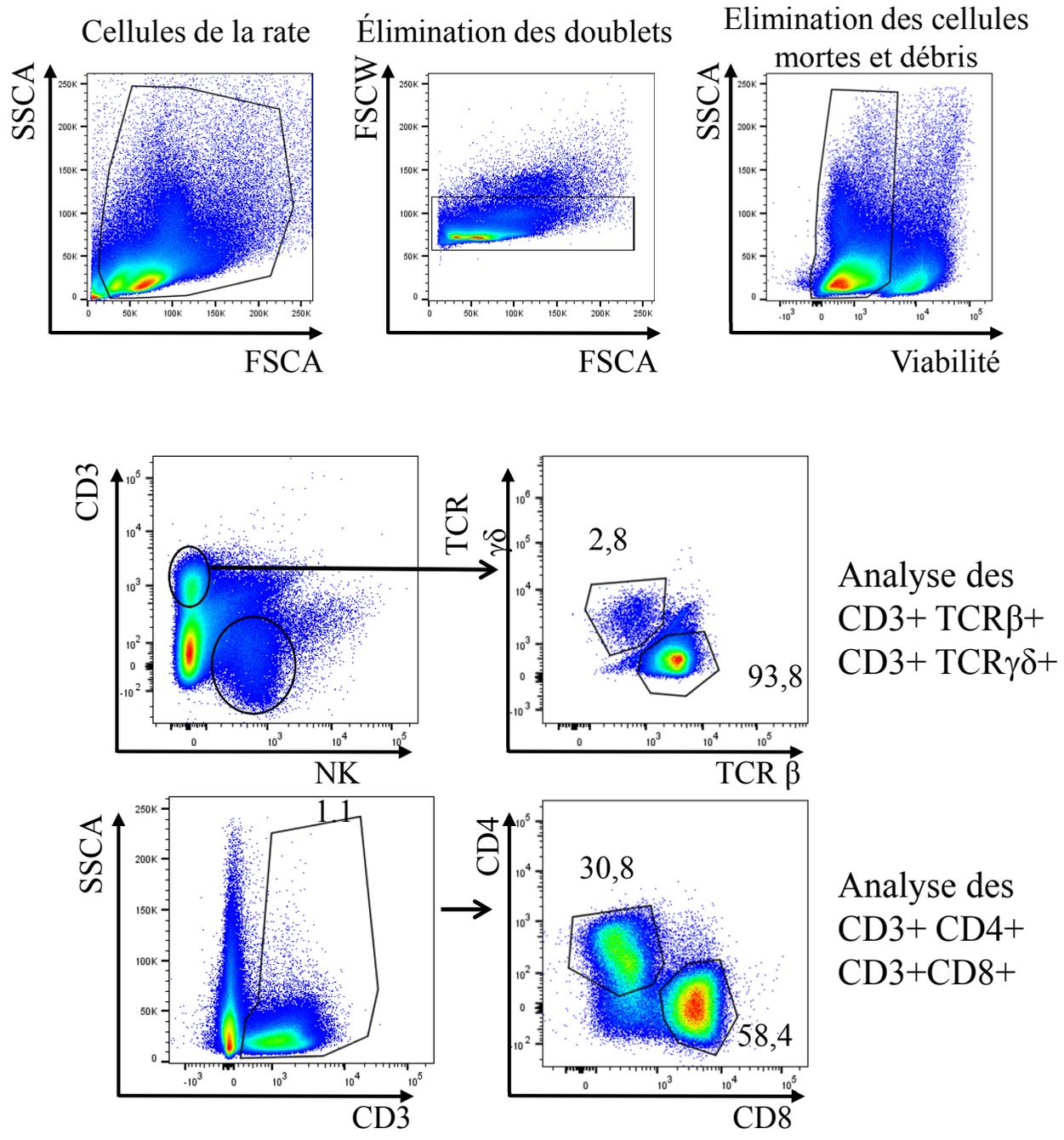


Figure 10 : Stratégie d'analyse de cytométrie pour la rate

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) et au jour 15(pic de la maladie). La rate a été récupérée pour les analyses de cytométrie. Les cellules ont été marquées pour la détection CD3, CD4, CD8, NK1.1, TCR β et TCR $\gamma\delta$.

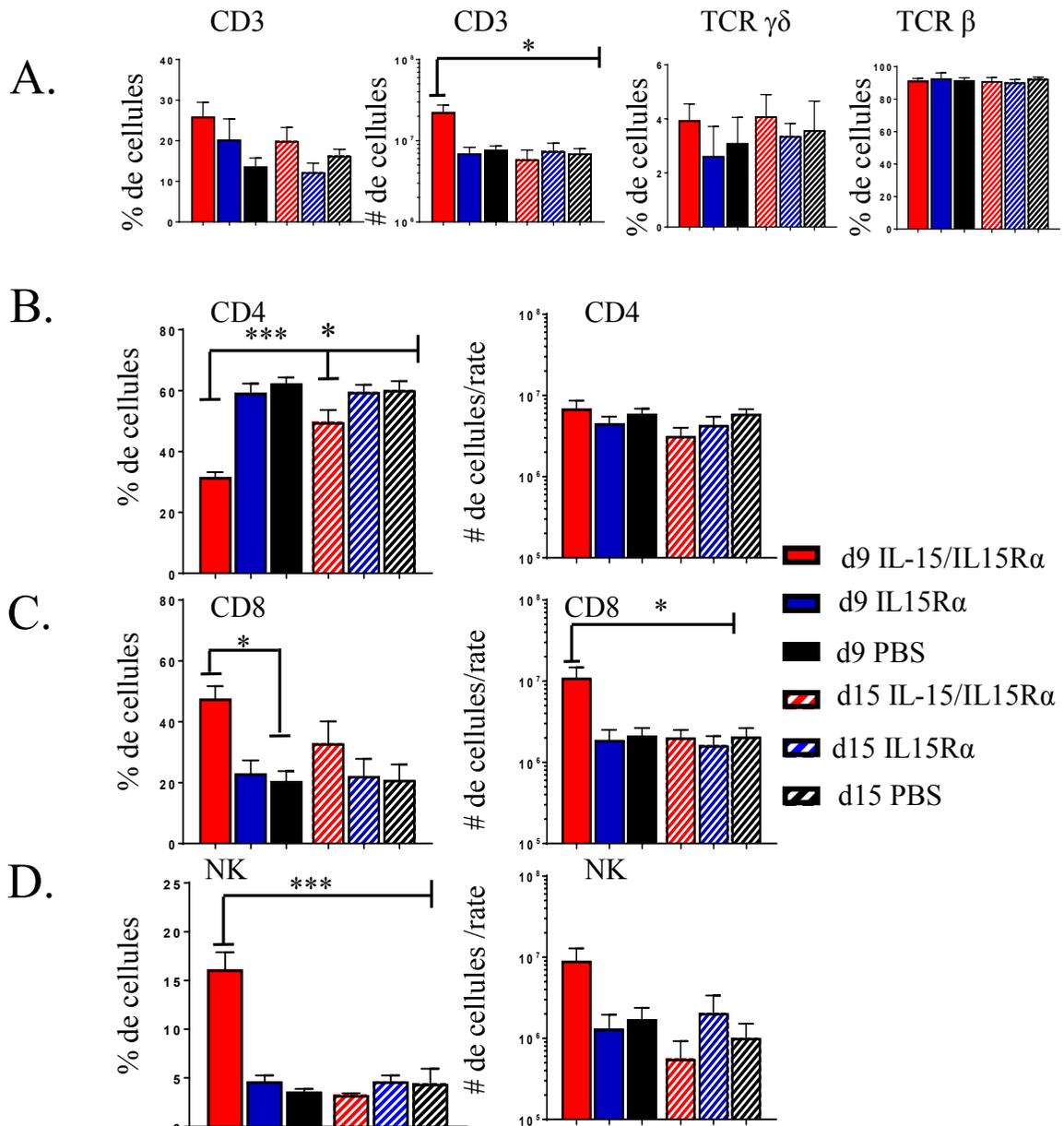


Figure 11 : Les souris injectées à l'IL-15 ont plus de cellules T CD8 et de cellules NK en périphérie

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées au jour 9 (24h post injection) après la dernière injection ou au jour 15 (pic de la maladie). Les souris ont été perfusées au PBS puis la rate a été récupérée pour les analyses de cytométrie. A. Graphiques illustrant le pourcentage (%) et le nombre (#) de cellules T CD3 et les types de TCR dans la rate. B.C.D Graphiques représentant le % et le # de cellules CD4, CD8 et NK dans la rate. n=3-4 par groupe, "one-way ANOVA", Bonferroni post test *** $p \leq 0,001$ ** $p \leq 0,01$ * $p \leq 0,05$

Les souris injectées à l'IL-15 ont plus de cellules susceptibles de répondre à l'IL-15 que les groupes contrôles.

Puisqu'il y avait une augmentation des populations de lymphocytes T CD8 et de cellules NK dans la rate suite aux injections d'IL-15 complexée en début d'EAE, ces cellules ont été analysées pour savoir si elles exprimaient le récepteur pour cette cytokine. Comme pour le SNC, la stratégie d'analyse a été effectuée sur les lymphocytes T CD4, CD8 et les cellules NK positives pour le récepteur CD122 (Figure 12 A). Comme déjà mentionné, CD122 est la chaîne β du récepteur à l'IL-15 qui est partagée seulement avec l'IL-2. Les marquages de cytométrie ont aussi inclus la détection de la chaîne CD132, soit la chaîne commune γ partagée avec l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-21 (Figure 12 A). Tel que mentionné pour les analyses du SNC, étant donné la faible détection de CD132 dans certaines populations, les cellules positives pour CD122 sans égard à la détection de CD132 ont été analysées. Plus de 70 % des lymphocytes T CD4 spléniques exprimaient le CD122 dans le groupe injecté avec le PBS, ce pourcentage était similaire pour les deux autres groupes étudiés (Figure 12 B) : IL-15 complexée et IL-15R α même si la variation au sein de ce dernier groupe était plus importante au jour 9. Les différences pour le pourcentage de lymphocytes T CD4 positif pour CD122 entre le jour 9 et le jour 15 n'étaient pas statistiquement significatives. La proportion des lymphocytes T CD8 spléniques qui exprimait le récepteur CD122 était élevée dans tous les groupes, plus de 92 % ; cette proportion était très similaire entre les différents groupes et ce aux deux moments choisis (d9 et d15) même si certains groupes avaient de plus grands écarts (Figure 12 B). A l'inverse, il y a eu une augmentation significative dans le pourcentage des cellules NK qui exprimaient le CD122 dans le groupe injecté avec l'IL-15 complexée au jour 9, en comparaison aux autres groupes du même jour et aussi en comparaison avec le groupe au J15.

Les niveaux d'expression par cellule de la molécule CD122 ont été estimés par la mesure de MFI. L'expression moyenne de CD122 par les lymphocytes T CD4 spléniques était similaire pour tous les groupes (Figure 12 B). Toutefois, cette expression moyenne était significativement augmentée pour les lymphocytes T CD8 spléniques au jour 9 dans le groupe ayant reçu de l'IL-15 complexée en comparaison à tous les groupes incluant ceux du jour 15. Cette observation suggère que les lymphocytes T CD8 ont besoin d'un apport constant d'IL-15 en périphérie pour augmenter leur niveau d'expression moyen de CD122 à leur surface. Les cellules NK avaient

des niveaux moyens d'expression de CD122 nettement supérieurs à ceux observés sur les lymphocytes T CD4 et CD8 (Figure 12 B). Toutefois, ces niveaux sur les cellules NK étaient très similaires entre tous les groupes et les deux moments d'analyse (d9 et d15). Ces observations suggèrent que l'exposition à des niveaux élevés d'IL-15 n'augmente pas les niveaux d'expression de CD122 par cellule NK, mais seulement la proportion de ces cellules qui portent à leur surface cette molécule.

Ces résultats obtenus sur la rate tous comme ceux obtenus sur le SNC suggèrent que les populations de lymphocytes T CD8 et de cellules NK ont répondu aux traitements d'IL-15 particulièrement au jour 9 soit en augmentant leur nombre et/ou leur expression du récepteur CD122. Par contre, ces cellules semblent avoir besoin d'un apport constant en IL-15 pour maintenir cette réponse puisqu'il y a une diminution des différences observées au pic de la maladie, soit quelques jours après la dernière injection de la cytokine. Ces résultats suggèrent que l'IL-15 stimule majoritairement les lymphocytes T CD8 et des cellules NK puisqu'il n'y a pas de changement significatif pour les lymphocytes T CD4.

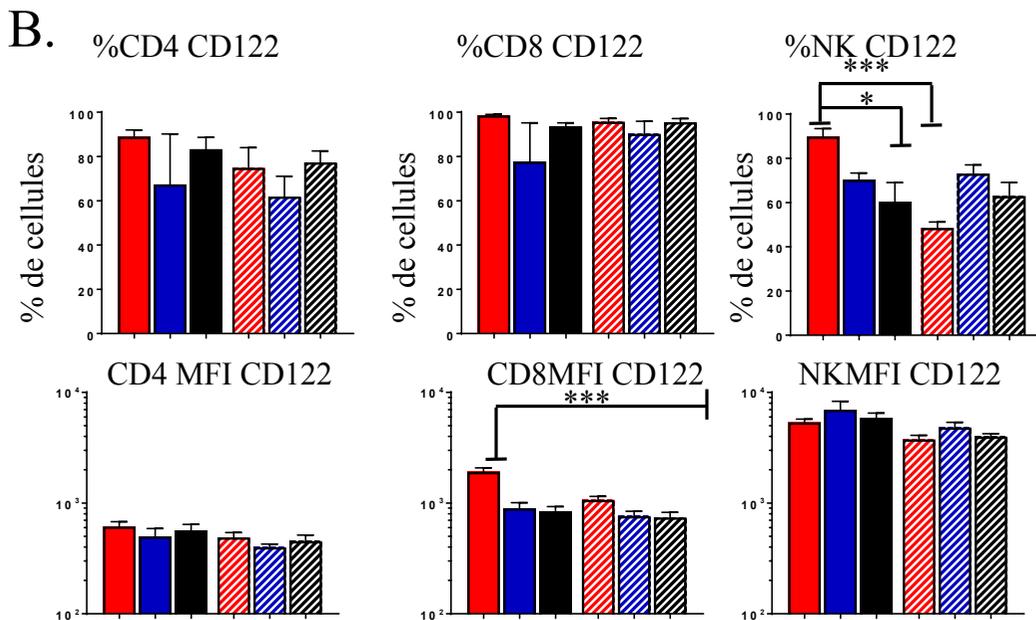
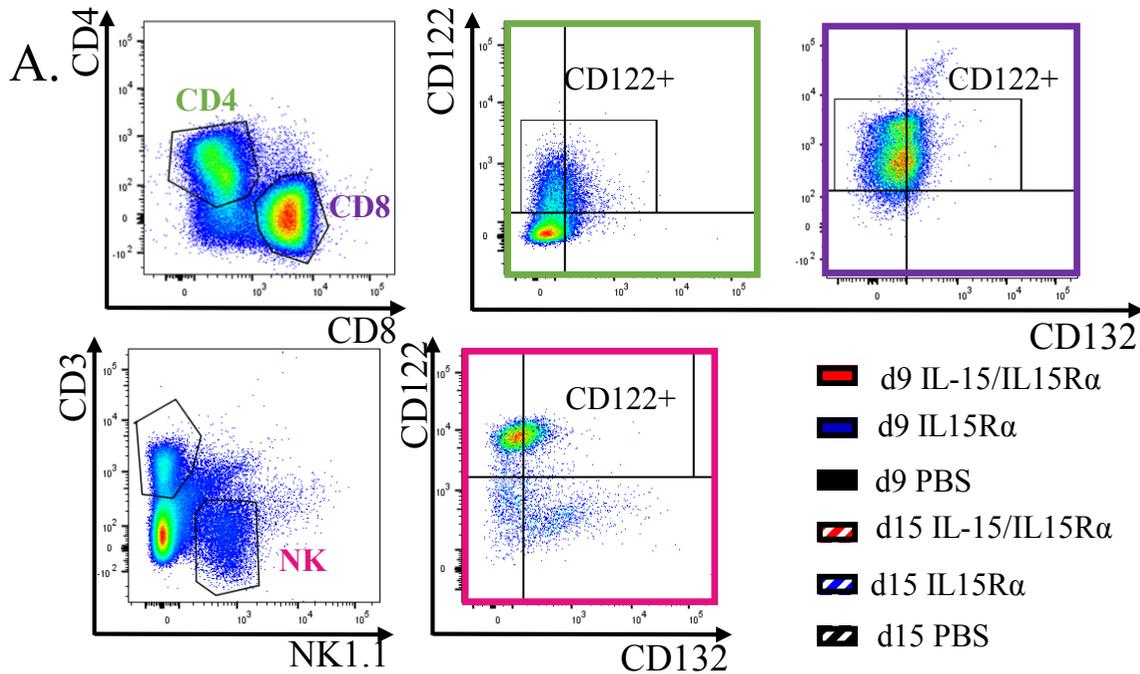


Figure 12: Les souris injectées à l'IL-15 possèdent plus de cellules NK positives pour le récepteur CD122 et des niveaux plus élevés de CD122 sur les cellules T CD8 de la rate
 Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) ou au jour 15 (pic de la maladie). La rate a été récupérée pour les analyses de cytométrie A. Nuages de points illustrant la stratégie d'analyse de cytométrie. B. Graphiques représentant la quantification des cellules CD4 CD8 NK positives pour CD122 ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence pour CD122. n=3-4 par groupe, "one-way ANOVA", Bonferroni post test *** $p \leq 0,001$ * $p \leq 0,05$

Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des lymphocytes T CD4 en périphérie

Comme pour le SNC, la même stratégie utilisant les marqueurs CD44, KLRG1 et CD127 pour le phénotypage des lymphocytes T spléniques a été utilisée. Par contre, dans la stratégie d'analyse de cytométrie, les lymphocytes spléniques contiennent une population négative pour CD44, une population intermédiaire pour CD44 (CD44 low) ainsi qu'une population exprimant des niveaux élevés de CD44 (CD4hi). Les populations CD4hi et CD4lo ont été analysées pour identifier le phénotype de lymphocytes T qui pourraient potentiellement répondre aux injections d'IL-15 (Figure 13a). Les proportions de cellules MPEC parmi les lymphocytes T CD4+CD122+ CD4hi + par rapport aux lymphocytes T CD4+CD122+ CD4lo étaient similaires. Toutefois, parmi les lymphocytes T CD4+CD122+ le sous-groupe des cellules CD4hi comprenait une plus grande proportion de cellules SLEC et DPEC et une proportion plus faible de cellules EEC que les cellules CD4lo (figure 13 B). Toutefois, toutes les proportions de cellules MPEC, EEC, DPEC et SLEC étaient similaires le groupe de souris injectées à l'IL-15 et les deux groupes contrôles pour les différents phénotypes basés sur l'expression de CD122, CD44, KLRG1 et CD127 (figure 13 B). Ces résultats suggèrent que les injections d'IL-15 complexée n'ont pas eu des effets détectables (CD44, CD122, KLRG1, CD127) sur les populations de lymphocytes T CD4.

Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des lymphocytes T CD8 en périphérie

Les lymphocytes T CD8 spléniques ont aussi été analysés pour l'expression de CD122, CD44, KLRG1 et CD127. Les mêmes populations de CD44 négatif, CD44 intermédiaire (CD44int) et CD44high ont aussi été détectées sur les lymphocytes T CD8 tout comme pour les lymphocytes T CD4 (Figure 14A). Les populations de cellules EEC et MPEC étaient plus abondantes parmi les deux groupes de lymphocytes T CD8+CD122+ qu'elles soient CD4hi ou CD4int. La proportion des cellules EEC a légèrement augmenté dans le groupe ayant reçu

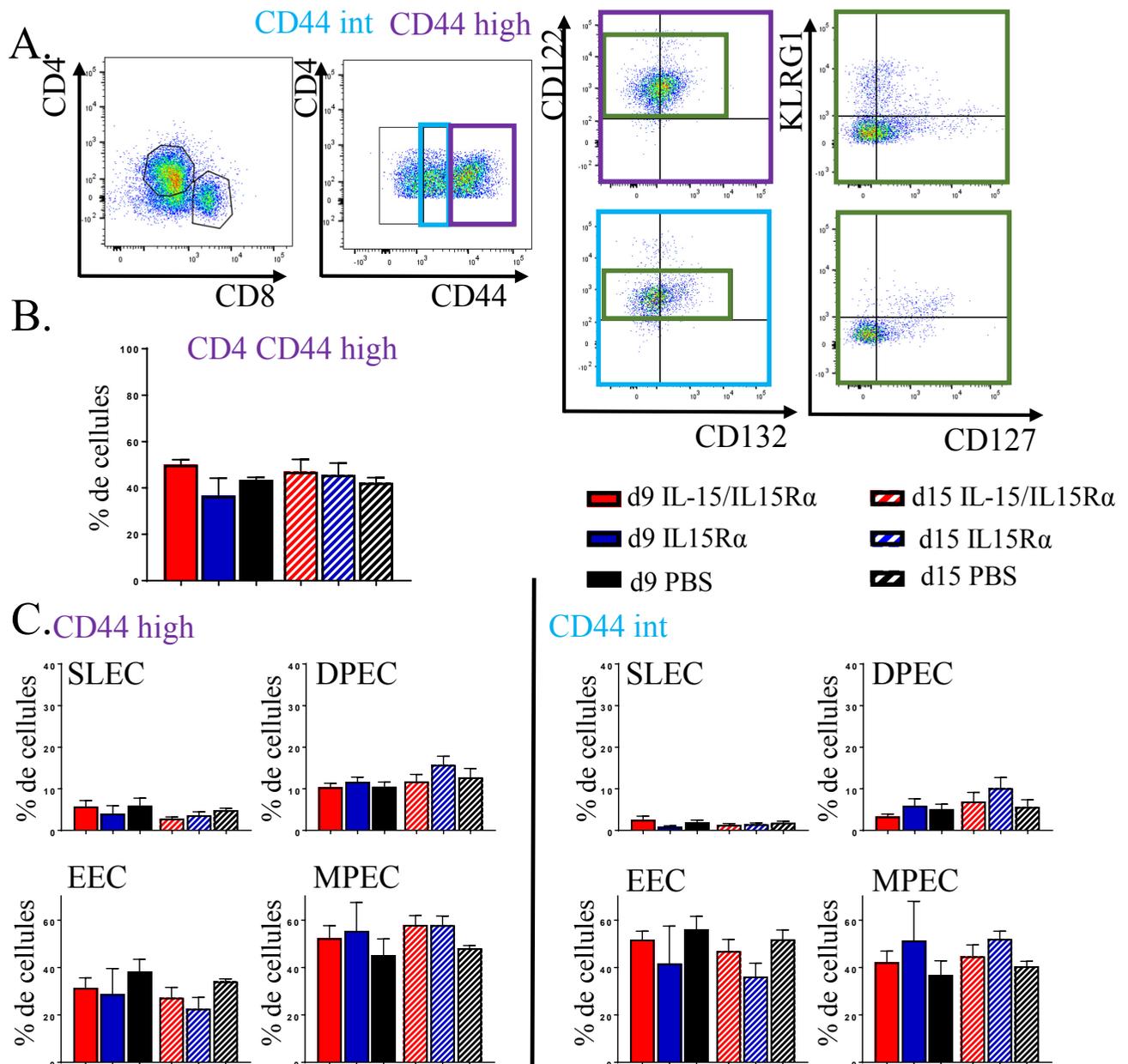


Figure 13 : Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des lymphocytes T CD4 en périphérie

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) ou au jour 15 (pic de la maladie). La rate a été récupérée pour les analyses de cytométrie. A. Nuages de points illustrant la stratégie d'analyse de cytométrie. B. Graphique représentant le % de CD4+ CD44 high C. Graphiques représentant la quantification du phénotype des lymphocytes T CD4 en périphérie. SLEC: Cellules effectrices de courte longévité DEPC: Cellules effectrices doubles positives EEC: Cellule effectrices précoces MPEC: Précurseurs de cellules mémoires. n=3-4 par groupe

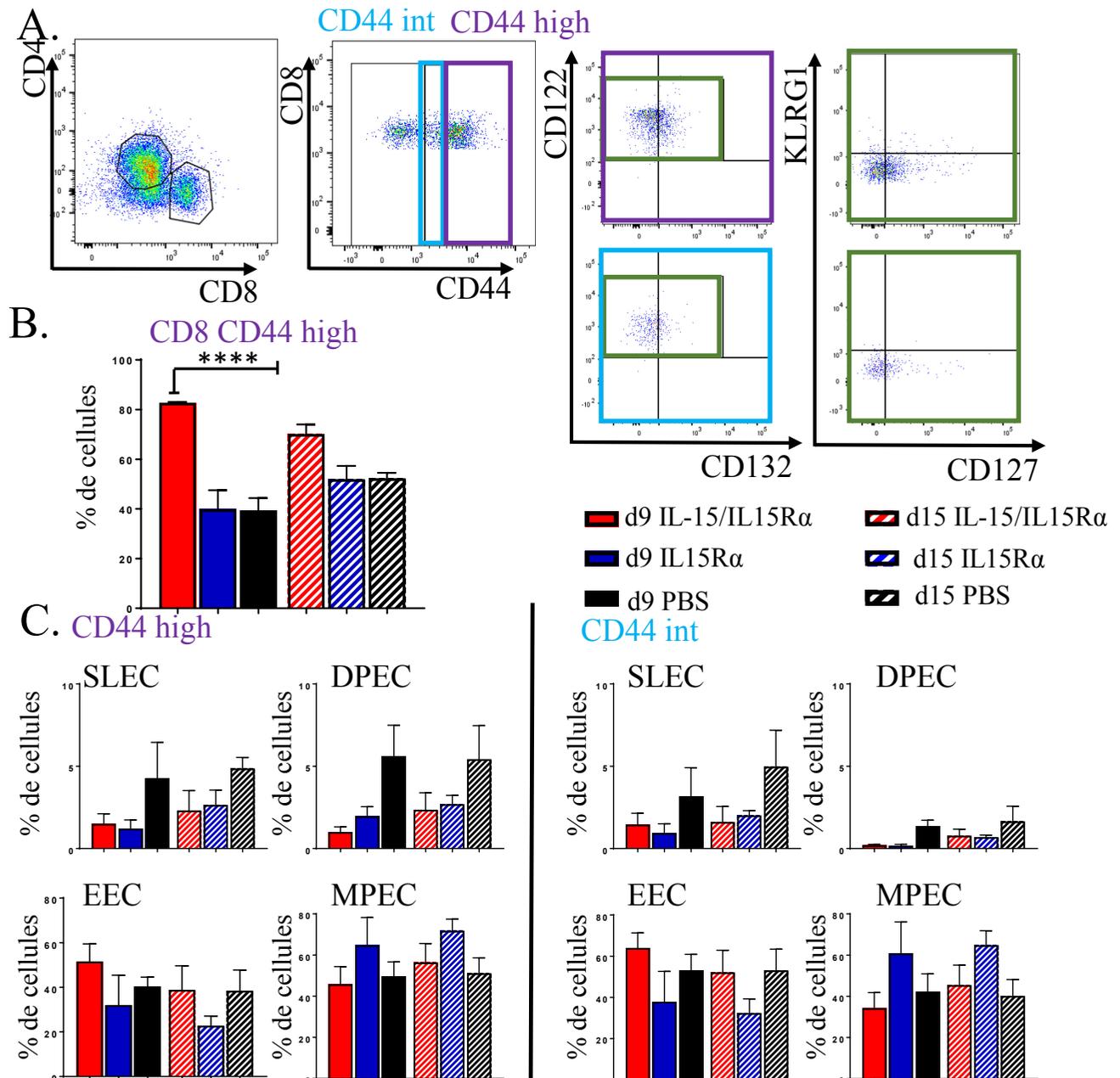


Figure 14 : Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur le phénotype des lymphocytes T CD8 en périphérie

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) ou au jour 15 (pic de la maladie). La rate a été récupérée pour les analyses de cytométrie. A. Nuages de points illustrant la stratégie d'analyse de cytométrie. B. Graphique représentant le % de CD8⁺ CD44^{high}. C. Graphiques représentant la quantification du phénotype des lymphocytes T CD8 en périphérie. SLEC: Cellules effectrices de courte longévité DEPC: Cellules effectrices doubles positives EEC: Cellule effectrices précoces MPEC: Précurseurs de cellules mémoires. n= 3-4 par groupe "one-way ANOVA", Bonferroni post test **** $p \leq 0,0001$

l'IL-15 complexée par rapport aux groupes contrôles au jour 9 (figure 14 B). Très peu (0,88 %) de lymphocytes T CD8 CD44^{low} CD122⁺ présentaient le phénotype DPEC. Toutefois, ce phénotype (KLRG1+CD122⁺) était plus présent dans les lymphocytes T CD8+CD122+CD44^{hi}, mais semblait avoir diminué en proportion suite aux injections d'IL-15 complexée à jour 9 par rapport aux groupes contrôles (figure 14 B). Pour toutes les comparaisons entre les sous-populations de lymphocytes T CD8 exprimant CD122, aucune différence significative n'a pu être détectée dans le phénotype basé sur l'expression des marqueurs CD44, KLRG1 et CD127.

Les injections d'IL-15 ont un effet sur l'expansion des lymphocytes T CD8 dans la périphérie. Nous avons fait l'analyse des populations CD44 high dans la rate seulement puisque dans le SNC on ne distingue pas de sous-population de CD44. Les cellules qui sont CD44 high nous donne un indice de l'expansion de ces cellules en réponse aux injections. Les souris qui ont été injectées avec le complexe IL-15 ont une plus grande proportion de lymphocytes T CD8 qui sont CD44^{hi} comparativement aux groupes contrôles au jour 9 et au jour 15 (Figure 14B). Cette observation n'est pas significative pour les lymphocytes T CD4 (Figure 13B).

Les injections d'IL-15 n'affectent pas la sécrétion de cytokines en périphérie

L'IL-15 a la capacité d'influencer plusieurs fonctions des lymphocytes T, plus particulièrement les lymphocytes T CD8 (Abadie and Jabri 2014). L'IL-15 peut augmenter la production de cytokines telles l'IFN γ . La sécrétion cytokinique des lymphocytes T spléniques des différents groupes a donc été étudiée afin d'évaluer l'impact de l'IL-15 sur les fonctions lymphocytaires. Les splénocytes ont été stimulés pour une courte période en présence de PMA, ionomycine et brefeldin A tel que décrit dans la section matériel et méthodes. Les cellules ont ensuite été marquées pour des antigènes de surface et puis après perméabilisation, des marquages pour la détection de cytokines (IFN γ , TNF et GM-CSF) ont été effectués. Ces cytokines ont été sélectionnées à cause de leur rôle bien connu dans la pathogenèse de l'EAE (Croxford, Spath et al. 2015) (Imitola, Chitnis et al. 2005, Sonderegger, Iezzi et al. 2008). Les lymphocytes T CD4

et CD8 ainsi que les cellules NK ont été analysés pour la production de ces molécules (Figure 15). Un exemple typique de détection et de stratégie d'analyse est illustré (Figure 15) et les données compilées pour trois à quatre souris par groupe sont présentées à la figure 14.

Le pourcentage de lymphocytes T CD4 (19 % vs 24 %) et CD8 (13,9 % vs. 34,5 %) pouvant produire du GM-CSF semblaient légèrement augmenté au jour 15 par rapport au jour 9 ; toutefois les pourcentages étaient similaires entre les groupes de traitements. Ces observations suggèrent que la cinétique de la maladie EAE plutôt que les injections ont induit des différences de capacité à produire cette cytokine.

Le pourcentage de lymphocytes T CD4 qui produisaient de l'IFN γ était légèrement augmenté au jour 15 par rapport au jour 9 ($p=0.0697$) et ce pour tous les groupes traités. Les proportions de lymphocytes T CD8 et de cellules NK produisant l'IFN γ étaient plus faibles que ceux des lymphocytes T CD4. Aucune différence n'a pu être détectée entre le groupe des souris traitées à l'IL-15 complexée par rapport aux groupes contrôles du même jour.

Pour le TNF, les pourcentages de lymphocytes T CD4 (44,2 % vs. 61,4 %), lymphocytes T CD8 (19,8% vs. 42%) et cellules NK (2,7 vs. 5,6 %) pouvant produire cette cytokine ont augmenté entre le jour 9 et jour 15. Alors que le traitement à l'IL-15 complexée n'a pas induit de différence marquée pour les lymphocytes T CD4 ou CD8, une tendance vers une augmentation de la production du TNF a été observée pour les cellules NK tant au jour 9 qu'au jour 15 en comparaison aux deux groupes contrôles. Ces résultats suggèrent que les injections à l'IL-15 complexée ont induit une augmentation de la production de TNF par les cellules NK.

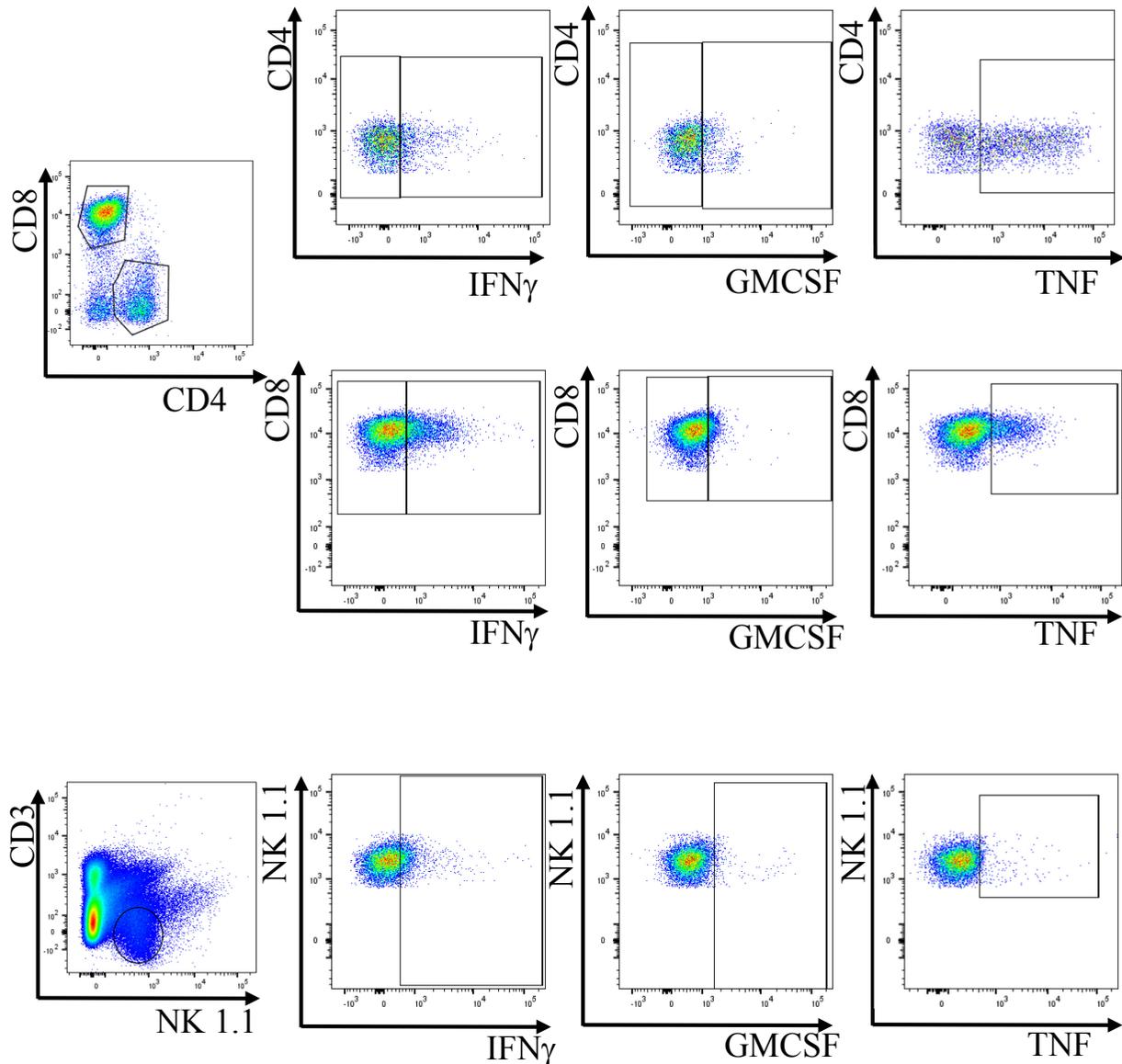


Figure 15 : Stratégie d'analyse de cytométrie pour l'expression de cytokines en périphérie

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) et au jour 15. La rate a été récupérée pour les analyses de cytométrie. Les cellules ont été stimulées avec du PMA, de l'Ionomycine et de la bréfeldine A à 37°C pendant 5 heures. Les cellules ont été marquées pour la détection CD3, CD4, CD8, NK1.1, TNF α , GMCSF et IFN γ .

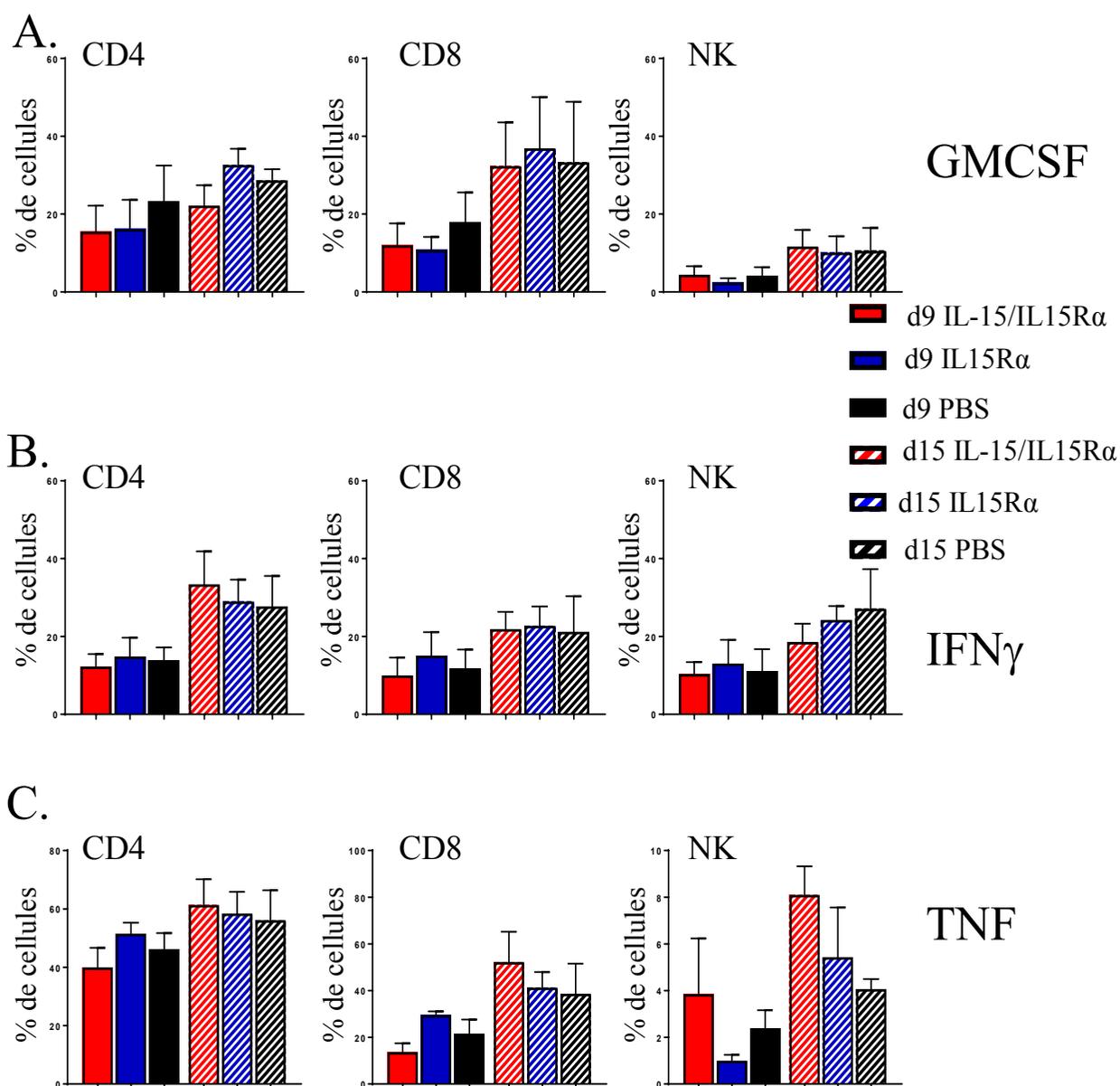


Figure 16 : Les injections d'IL-15 n'ont pas d'effet sur la secretion de cytokine en périphérie

Les souris ont été injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ou un des contrôles (IL-15R α seul ou PBS) pendant 8 jours à partir du moment qu'elles ont atteint un score clinique de 1,0-1,5. Les souris ont été euthanasiées et perfusées au PBS au jour 9 (24h post injection) ou au jour 15 (pic de la maladie). La rate a été récupérée pour les analyses de cytométrie. Les cellules de la rate ont été incubées 5 heures avec de la PMA, de l'Ionomycine et de la bréfeldine A. A. Graphiques représentant l'expression de GMCSF par les CD4, CD8 et les cellules NK B. Graphiques représentant l'expression d'IFN γ par les CD4, CD8 et NK C. Graphiques représentant l'expression de TNF par les CD4, CD8 et les cellules NK. n=3-4 par

Discussion

L'IL-15 a été impliquée dans plusieurs maladies de par son rôle important dans le maintien et la survie des lymphocytes T CD8, les cellules NK et les cellules NKT (Abadie and Jabri 2014). Des niveaux plus élevés de cette cytokine ont été retrouvés dans les liquides physiologiques ou les organes de patients atteints de maladies inflammatoires telles les maladies inflammatoires de l'intestin et la polyarthrite rhumatoïde (Abadie and Jabri 2014).

Notre laboratoire s'est intéressé au rôle de cette cytokine dans le contexte de la SEP, une maladie inflammatoire chronique du SNC. Notre groupe a précédemment montré que les niveaux d'IL-15 sont plus élevés chez les patients atteints de la SEP au sein du SNC et en périphérie (Saikali, Antel et al. 2010, Schneider, Mohebiany et al. 2011). En effet, les astrocytes des lésions de SEP produisent de l'IL-15 et les lymphocytes T CD8 qui infiltrent le SNC de ces patients se trouvent à proximité de ces astrocytes (Saikali, Antel et al. 2010). De plus, les astrocytes humains en culture primaire augmentent leur niveau d'IL-15/IL-15R α à leur surface en réponse à des stimuli inflammatoires (Saikali, Antel et al. 2010). Ces niveaux élevés d'IL-15 fournis par des astrocytes activés sont suffisants pour augmenter les propriétés cytotoxiques de lymphocytes T CD8 (Saikali, Antel et al. 2010). Ces données suggèrent que L'IL-15 produite dans le SNC, joue un rôle dans l'augmentation de la cytotoxicité locale et conséquemment dans la destruction tissulaire observée chez ces patients. En périphérie, notre laboratoire a montré que les proportions de lymphocytes B et de monocytes du sang de patients atteints de la SEP qui expriment l'IL-15/IL-15R α à leur surface sont augmentées comparativement aux témoins sains (Schneider, Mohebiany et al. 2011). Les lymphocytes T CD8 isolés du sang des patients SEP démontrent une plus grande susceptibilité aux capacités de l'IL-15 à augmenter leurs propriétés inflammatoires : prolifération et production de médiateurs (e.g. granzyme B) que ceux isolés à partir du sang de donneurs sains (Schneider, Mohebiany et al. 2011). De plus, la concentration d'IL-15 est plus élevée dans le liquide cérébro-spinal et le sérum des patients atteints de SEP que dans les échantillons provenant de patients atteints de maladies neurologiques non-inflammatoires (Rentzos, Cambouri et al. 2006). Ces données suggèrent donc que des niveaux anormalement élevés de l'IL-15 en périphérie peuvent aussi contribuer aux mécanismes inflammatoires délétères chez les patients atteints de SEP.

Expression de l'IL-15 dans l'EAE

Suite aux observations obtenues du sang et des tissus cérébraux des patients SEP, nous voulions établir et caractériser le rôle de l'IL-15 dans le modèle EAE qui est le plus couramment utilisé pour investiguer des mécanismes inflammatoires dans le contexte de la SEP. Pour déterminer l'impact de l'IL-15 dans ce modèle, l'expression à différents stades de la maladie a été faite. Nos données montrent une augmentation statistiquement significative des niveaux de l'ARNm de l'IL-15 au pic de la maladie dans la moelle épinière et le tronc cérébral (figure 3A). Une telle augmentation n'a pas été détectée dans la rate. Cependant, cette cytokine est fortement régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Il sera donc nécessaire de confirmer qu'une telle augmentation des niveaux d'ARNm se traduit par des niveaux augmentés de la protéine. De plus l'expression de la protéine peut être affectée selon le cadre de lecture emprunté puisque le gène codant de l'IL-15 possède plusieurs codons d'initiations (Waldmann and Tagaya 1999). De plus, tel que décrit dans l'introduction, l'IL-15 possède deux isoformes selon la longueur de la région UTR et ces isoformes codent pour des protéines fonctionnelles, mais empruntent des voies sécrétoires différentes (Prinz, Hanisch et al. 1998). Nos résultats démontrent qu'il est pertinent d'investiguer davantage l'expression d'IL-15 au cours des différents stades de la maladie dans ce modèle animal. D'autres groupes ont démontré que les augmentations d'ARNm de l'IL-15 dans le SNC de rats ayant subi un autre type d'insulte tissulaire se traduisaient par une augmentation de l'expression de la protéine dans le SNC (Gómez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008).

Afin de mieux caractériser l'expression au niveau protéique, nous avons essayé la méthode d'immunobuvardage de type Western sur les tissus du SNC et de la rate. Cette technique pourrait nous permettre de distinguer les deux isoformes de la cytokine. Notre laboratoire a réussi avec succès à détecter l'expression protéique de médiateurs immunologiques (ligand NKG2D) dans ces organes et même à quantifier une augmentation de l'expression au sein du SNC pendant le développement de l'EAE. Toutefois, après plusieurs tentatives d'optimisation de la technique, nous avons conclu que la concentration dans les homogénats de tissus semble être trop petite pour la sensibilité de cette technique. Nous avons testé une trousse d'ELISA commercialement disponible pour la détection du complexe IL-15/IL-15R α et un

protocole utilisé pour faire des tests ELISA sur des homogénats de tissus (Gómez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008). Notre première tentative a été infructueuse, mais nous allons retenter cette technique pour évaluer l'expression protéique de l'IL-15 à différents stades de l'EAE. Les homogénats de tissus sont déjà récoltés et entreposés dans notre congélateur (-80 °C). Nous planifions aussi effectuer la détection d'IL-15 dans des coupes histologiques de différents organes des souris atteintes de l'EAE à différents stades de la maladie.

Les injections d'IL-15 affectent la pathogenèse de l'EAE

Plusieurs travaux ont démontré la contribution de l'IL-15 dans la neuroinflammation de plusieurs modèles. Dans le modèle de traumatismes des nerfs, l'IL-15 est exprimée en plus grande quantité par les cellules gliales au début de la réponse immunitaire (Gomez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008). Dans le modèle d'injection de LPS l'IL-15 est aussi plus exprimée par les astrocytes et les microglies activées. Dans cette étude, le blocage de l'IL-15, à l'aide d'un anticorps injecté en même temps que le LPS de façon intraventriculaire, renverse l'activation des cellules gliales (Gomez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008). Ce modèle est intéressant pour nous parce qu'il montre que l'IL-15 a un effet sur l'activation des cellules gliales du SNC dans un autre contexte que le trauma des nerfs. Dans un autre modèle d'auto-immunité, les injections d'IL-15 dans le modèle murin de l'arthrite rhumatoïde causent une plus grande infiltration de lymphocytes T dans le liquide synovial des articulations (McInnes, al-Mughales et al. 1996). Dans un ensemble, ces différents modèles montrent un effet plutôt délétère de l'IL-15 dans différents contextes ce qui nous mène à évaluer son rôle dans le modèle animal de la SEP.

Afin d'investiguer l'impact de l'IL-15 périphérique dans la progression de la maladie du modèle EAE, nous avons injecté l'IL-15 sous sa forme la plus physiologique, soit la forme complexée IL-15/IL-15R α à des souris qui avaient déjà commencé à développer des symptômes cliniques. La forme IL-15/IL-15R α complexée est celle qui est détectée dans les liquides physiologiques humains et murins (Bergamaschi, Bear et al. 2012). Nous avons injecté les mêmes doses (0,5 μ g d'IL-15 et 3 μ g d'IL-15R α) que celles que d'autres groupes avaient précédemment utilisées (Elpek, Rubinstein et al. 2010). Nos résultats ont montré que les injections du complexe IL-15/IL-15R α chez les souris EAE causent une maladie plus sévère que les deux groupes contrôles injectés avec l'IL-15R α ou du PBS (figure 4A, B). Les souris injectées avec le complexe IL-15/IL-15R α ont un état général diminué et une perte de poids plus

sévère. Nos résultats suggèrent que des niveaux élevés de l'IL-15 en périphérie contribuent à augmenter la sévérité de la maladie neuroinflammatoire.

Nos résultats sont contradictoires avec d'autres groupes ont publié en utilisant des souris déficientes en IL-15. L'induction de l'EAE au MOG chez des souris déficientes en IL-15, ayant un fond génétique C57BL/6, cause une EAE plus sévère que les souris sauvages (Wu, Pan et al. 2010, Pandiyan, Yang et al. 2012). Ces groupes ont ensuite investigué l'effet des injections d'IL-15 sur l'EAE des souris déficientes. Le traitement avec l'IL-15 a diminué la sévérité de l'EAE (Wu, Pan et al. 2010, Pandiyan, Yang et al. 2012). Leurs résultats suggèrent que l'IL-15 a un effet protecteur sur la pathogenèse de l'EAE. Toutefois, ces auteurs n'ont pas pris en considération le fait que les souris déficientes pour l'IL-15 ont un système immunitaire altéré. Les souris déficientes pour l'IL-15 ou l'IL-15R α ont une diminution marquée des cellules NK matures (Ranson, Vosshenrich et al. 2003). Au contraire, les souris transgéniques pour l'IL-15 montrent une augmentation des cellules NK (Ranson, Vosshenrich et al. 2003). De plus, les souris déficientes en IL-15R α montrent une lymphopénie. Par contre, elles ont un développement normal des lymphocytes B et T (Lodolce, Boone et al. 1998). Ces souris ont aussi un manque de lymphocytes T CD8 et de lymphocytes TCR $\gamma\delta$ intraépithéliaux (Lodolce, Boone et al. 1998). D'autres études ont montré l'importance des cellules NK et NKT dans la régulation de la pathogenèse de l'EAE. Les souris déficientes en cellules NK montrent une EAE plus sévère et une augmentation de la réponse de type Th1 (Zhang, Yamamura et al. 1997). La sévérité de la maladie est aussi associée à une prolifération des lymphocytes T (Zhang, Yamamura et al. 1997). Cependant, le rôle des cellules NK dans l'EAE est aussi un sujet à controverses dans la littérature. Ce sujet est discuté plus loin. Les souris déficientes pour IL-15 ont donc un manque de cellules potentiellement régulatrices qui peuvent influencer la pathogenèse de l'EAE. L'effet des injections d'IL-15 sur les scores d'EAE des souris déficientes pour l'IL-15 est plutôt minime (score passe de 2 à 1.5)(Wu, Pan et al. 2010). Il est possible qu'en ayant un système immunitaire différent des souris sauvage, le développement de l'EAE des souris déficientes en IL-15 soit altéré. Ce modèle n'est pas représentatif de l'augmentation de la concentration d'IL-15 observée chez les patients atteints de la SEP.

En second lieu, certaines de ces études (Wu, Pan et al. 2010) injectent seulement la cytokine recombinante. Nous avons opté pour une approche qui reflète la biologie et ce qui est mesuré dans les liquides biologiques. Le complexe IL-15/IL-15R α a été injecté aux souris EAE

après le début de la maladie lorsque les souris atteignaient un score de 1-1.5. Les injections du complexe IL-15/IL-15R α prolongent la demi-vie de la cytokine in vivo (Stoklasek, Schluns et al. 2006). Le complexe induit une plus grande prolifération des lymphocytes T CD8 mémoires, des cellules NK et des cellules NKT que la cytokine seule (Stoklasek, Schluns et al. 2006). Des études sur des modèles de cancer montrent que les injections du complexe IL-15/IL-15R α réduisent la formation de tumeurs (Stoklasek, Schluns et al. 2006). L'IL-15 produite chez les souris déficientes en IL-15R α a du mal à quitter le cytoplasme des cellules productrices, car cette voie est celle qui est principalement utilisée pour la sécrétion est la transprésentation (Rubinstein, Kovar et al. 2006). L'IL-15R α agit comme une protéine chaperonne afin d'éviter une dégradation précoce de la cytokine et promouvoir son effet. Finkelman et collègues ont aussi observé une situation semblable avec l'IL-4. Ils ont montré qu'un anticorps anti-IL-4 prolonge la survie de la cytokine et par le fait même son effet in vivo (Finkelman, Madden et al. 1993). Le complexe l'IL-15/IL-15R α semble avoir pour effet de changer la conformation de la protéine ce qui la rend plus disponible pour le complexe récepteur $\beta\gamma\epsilon$ sur les cellules qui y répondent (Rubinstein, Kovar et al. 2006). Pour finir, l'injection du complexe IL-15/IL-15R α se rapproche plus de ce qui est mesuré dans le sérum de l'humain et de la souris. Des études sur des patients lymphopéniques atteints de mélanome et un modèle de souris lymphopéniques montrent que l'IL-15 présent dans le sérum est en effet couplé à l'IL-15R α (Bergamaschi, Bear et al. 2012) suggérant que le complexe est clivé à la surface des cellules.

Au moment de l'euthanasie des souris, le plasma a aussi été récupéré et conservé à -80 °C. Le plasma servira à effectuer une cinétique de la concentration du complexe IL-15/IL-15R α après les injections à différents stades de la maladie à l'aide d'un test ELISA commercialement disponible.

Étant donné les résultats obtenus, il serait pertinent de tester dans un modèle d'EAE passive quelles cellules sont les plus pathogéniques et contribuent le plus à l'exacerbation de l'EAE en réponse aux injections d'IL-15/IL-15R α . Les EAE passives pourront être effectuées à l'aide des lymphocytes T CD4 et CD8 isolés de différents groupes de souris injectées. Le score clinique devra être suivi sur une période de 20 jours et plus après les injections d'IL-15 pour comparer la pathogénicité des différentes cellules injectées en réponse à l'IL-15. Les cellules des donneuses pourraient être distinguées par cytométrie en flux en utilisant des souris donneuses possédant l'allèle CD45.2, en contraste avec l'allèle CD45.1 des souris receveuses.

Il sera donc plus facile de phénotyper et de caractériser les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène MOG qui infiltrent le SNC suite aux injections d'IL-15.

Notre laboratoire travaille à bloquer pharmacologiquement et génétiquement, l'expression de l'IL-15 et d'évaluer l'effet sur la pathogenèse de l'EAE. Notre hypothèse est que les souris déficientes en IL-15 auront une EAE moins sévère que les souris sauvages. Pour l'approche génétique, nous avons opté pour une approche différente de celle utilisée par les autres groupes étant donné que le système immunitaire des souris totalement déficientes en IL-15 est compromis. Nous avons débuté un élevage de souris déficientes pour l'IL-15. Une cassette a été insérée dans le gène de l'IL-15 et possède des sites FRT et LOXP (figure 17). Par différents croisements, nous allons utiliser la technologie CRE recombinase afin d'éliminer l'IL-15 dans certains compartiments cellulaires seulement. Par cette approche, les souris seront immunocompétentes de naissance, mais auront une délétion sélective de l'IL-15, par exemple seulement au niveau des astrocytes (Cre-GFAP). Un autre groupe a démontré que l'injection d'un anticorps bloquant l'IL-15 peut renverser l'effet pro-inflammatoire de cette cytokine sur les cellules gliales dans le modèle de traumatisme nerveux chez le rat. Notre laboratoire effectue en ce moment des blocages pharmacologiques chez des souris EAE à l'aide d'anticorps bloquant la chaîne CD122 ou la chaîne CD25 pour disséquer les contributions distinctes de l'IL-15 et de l'IL-2. Une telle approche serait potentiellement applicable chez des patients atteints de la SEP.

Nous ne voulons pas utiliser de souris déficientes en IL-15R α pour tester l'influence de l'IL-15, parce que ces souris ont un phénotype plus athlétique. Les souris déficientes en IL-15R α sont plus résistantes à la fatigue, courent de plus grandes distances et possèdent plus de fibres musculaires (Pistilli, Bogdanovich et al. 2011). Le modèle que nous étudions est basé sur une paralysie ascendante. Le phénotype des souris athlétiques pourrait potentiellement compenser certains symptômes dans le développement de l'EAE.

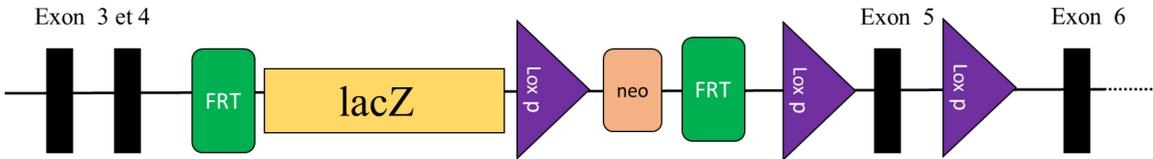


Figure 17 : Représentation génétique de la cassette insérée dans le gène de l'IL-15 de la souris déficiente en IL-15

Les sites FRT servent à enlever la cassette. Les souris issues de ce premier croisement seront compétentes pour l'IL-15. Les sites loxP serviront à enlever l'exon 5 du gène dans un compartiment cellulaire spécifique en utilisant la technologie Cre recombinase. Les souris proviennent de : <http://www.mousephenotype.org/data/alleles/MGI:103014/tm1a> (EUCOMM) Hmgu

L'effet des injections d'IL-15/IL-15R α sur les populations cellulaires

Malgré le fait qu'il n'y a pas de changement significatif (seulement des tendances) dans les populations de lymphocytes T et de cellules NK dans le SNC (figure 6 A, B, C, D), les injections d'IL-15 complexée ont eu un effet en périphérie (figure 11 A B, C,D). Il y a eu une plus grande proportion et un plus grand nombre de lymphocytes T CD8 et de cellules NK dans la rate 24 h après la dernière injection (figure 11 C). En contrepartie, il y a une moins grande fréquence de lymphocytes T CD4 qui est probablement due à l'augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8 (figure 11B). Cet effet est transitoire puisque les proportions de lymphocytes T sont revenues à un niveau équivalent aux groupes contrôles au pic de la maladie soit 5 à 7 jours après la dernière injection d'IL-15 complexée. Même si la fréquence des lymphocytes T CD4 a diminué à cause de l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8, le nombre absolu de lymphocytes T CD4 est resté semblable parmi tous les groupes (Figure 11). Les injections d'IL-15 complexée ne semblent pas avoir affecté la viabilité des lymphocytes T CD4. Nos résultats confirment que l'IL-15 complexée injectée était bel et bien biologiquement active.

Un autre modèle de souris ayant une production constante d'IL-15 par l'utilisation d'un vecteur viral, montre aussi des changements dans les populations de cellules immunitaires (Di Scala, Gil-Farina et al. 2016). Leur étude montre que l'IL-15 change le ratio des fréquences des lymphocytes T CD4/CD8 comme nous l'avons observé en périphérie (Di Scala, Gil-Farina et

al. 2016). Leur modèle démontre aussi une augmentation dans le nombre absolu des lymphocytes T CD4 et CD8. Dans notre cas, les injections d'IL-15 ne semblent pas avoir eu d'effet sur les lymphocytes T CD4 (Di Scala, Gil-Farina et al. 2016). Finalement, cette équipe montre aussi des changements dans la population de cellules NK, mais cette augmentation semble transitoire, comme nous l'avons aussi observée (Di Scala, Gil-Farina et al. 2016). Ces résultats suggèrent que l'augmentation transitoire des populations cellulaires pourrait (Winkler-Pickett, Young et al. 2008) affecter la pathogenèse de l'EAE en envoyant des lymphocytes T CD8 et NK dans le SNC et ainsi créer des dommages dans le SNC.

Les populations cellulaires qui infiltrent le SNC en réponse à l'IL-15

Les études sur les souris déficientes pour l'IL-15 et sur lesquelles l'EAE a été induite montrent une augmentation des infiltrats de lymphocytes T CD4 et CD8 dans le SNC, mais un nombre moins grand des cellules NK (Gomez-Nicola, Spagnolo et al. 2010). Comme mentionné plus haut, les souris déficientes en IL-15 ont une diminution marquée des cellules NK et une lymphopénie. Il est logique de croire que si le système immunitaire des souris déficientes possède moins de cellules NK, que celles-ci soient en moins grande proportion dans SNC après l'induction de l'EAE. Nos résultats sur des souris immunologiquement compétentes recevant des injections d'IL-15 complexée ne montrent pas de changement marquant dans les populations de lymphocytes T ayant infiltrées le SNC (Figure 6 A, B, C, D). Dans le cas des cellules NK, nous avons observé une tendance à l'augmentation dans le SNC en réponse aux injections (Figure 6D) ; cette tendance devra être confirmée avec un plus grand nombre de souris.

Le rôle des cellules NK est bien connu dans le système immunitaire inné. C'est la première ligne de défense contre les agents viraux et bactériens. Cependant, il y a de plus en plus d'évidences qu'elles jouent aussi un rôle dans le système immunitaire adaptatif (Winkler-Pickett, Young et al. 2008). Il est discuté dans la littérature que les cellules NK participent à la différenciation des lymphocytes T et communiquent étroitement avec les cellules dendritiques. Les souris EAE déficientes en CX3CR1 ont moins d'infiltrats de cellule NK dans le SNC (Winkler-Pickett, Young et al. 2008). Les cellules NK sont aussi connues pour être des productrices d'IFN γ qui favorisent la polarisation des lymphocytes T en Th1 (Winkler-Pickett, Young et al. 2008). Dans le modèle EAE, le rôle des cellules NK a été investigué par plusieurs équipes. Certaines études ont montré un rôle régulateur des cellules NK dans l'EAE. Une

déplétion avec des anticorps déplétant ou une déficience en NK, a causé une EAE plus sévère (Zhang, Yamamura et al. 1997, Matsumoto, Kohyama et al. 1998). Par opposition, Winkler-Pickett et collaborateurs ont montré qu'une déplétion des cellules NK avant l'immunisation avec le MOG₃₅₋₅₅ a causé une EAE moins sévère. Cependant, une déplétion après l'immunisation au MOG₃₅₋₅₅ n'a pas d'effet sur le score de l'EAE (Winkler-Pickett, Young et al. 2008). Selon ce groupe, les cellules NK jouent un rôle au début de la réponse immunitaire plutôt que dans la phase aiguë (Winkler-Pickett, Young et al. 2008).

Une étude sur des cellules humaines de patient SEP montre aussi le rôle régulateur des cellules NK suite au traitement avec le daclizumab (Gross, Schulte-Mecklenbeck et al. 2016). Il s'agit d'un anticorps anti-CD25 qui bloque la signalisation de l'IL-2. Selon Gross et collaborateurs, la signalisation via le récepteur de haute affinité (CD122/CD132/CD25) de l'IL-2 est bloquée par cet anticorps. Par contre, les cellules qui expriment le récepteur de faible affinité (sans le CD25) peuvent toujours réagir à l'IL-2. En conséquence, les cellules NK qui ont des propriétés régulatrices sont plus activées et plus importantes en nombre et agissent plus efficacement pour réguler les lymphocytes T CD4 pathogéniques (Gross, Schulte-Mecklenbeck et al. 2016).

Nos résultats ne permettent pas d'identifier le rôle des cellules NK dans notre modèle. Nous émettons l'hypothèse que dans le contexte des niveaux élevés d'IL-15, les cellules NK peuvent augmenter leurs propriétés inflammatoires et donc leur potentiel impact cytotoxique. Étant donné que les augmentations de cellules NK ont été transitoires, d'autres expériences seront nécessaires pour caractériser le phénotype des cellules NK qui infiltrent le SNC après les injections d'IL-15. Le profil d'expression des cytokines peut être un bon indice du rôle que les cellules NK infiltrant le SNC jouent au début de la maladie suite aux injections d'IL-15 complexée.

Les cellules aptes à de répondre aux injections d'IL-15 (les CD122+)

Les cellules les plus susceptibles de répondre aux injections d'IL-15 complexée sont les cellules NK et les lymphocytes T CD8 (Abadie and Jabri 2014). Les cellules positives pour CD122 ont été analysées et catégorisées comme étant les cellules qui sont susceptibles de répondre aux injections d'IL-15 complexée. Dans le SNC, le pourcentage des cellules qui expriment CD122 chez les lymphocytes T CD8 n'a pas varié parmi les groupes (figure 7 B). Par contre, nos

résultats montrent une tendance à l'augmentation de la quantité de récepteurs CD122 exprimés (MFI) sur les lymphocytes T CD8 suggérant que ces cellules ont une plus grande susceptibilité aux effets amplificateurs de l'IL-15 et potentiellement affectent la pathogenèse de l'EAE.

Yu et collègues ont suggéré, dans le modèle EAE, que les lymphocytes T CD8 exprimant le récepteur CD122 représentent une population de lymphocytes régulateurs (Yu, Bamford et al. 2014). Ces auteurs ont déplété les cellules exprimant la chaîne CD122 à l'aide d'un anticorps 24 heures avant l'induction de l'EAE. Selon leurs résultats, les souris EAE déplétées ont développé une maladie plus sévère (Yu, Bamford et al. 2014). Ces auteurs suggèrent que la régulation par les lymphocytes T CD8 CD122+ est dépendante de la signalisation de l'IL-15. Ils ont induit l'EAE chez des souris déficientes en IL-15 et ont observé une maladie plus sévère (Yu, Bamford et al. 2014). Par la suite, cette équipe a effectué des transferts adoptifs de lymphocytes T CD8+CD122+ et de lymphocytes CD8+ CD122-. Le transfert des cellules CD122+ a diminué le développement de la maladie tandis que les lymphocytes CD8+CD122- transférés n'ont pas eu d'impact sur les scores cliniques de l'EAE (Yu, Bamford et al. 2014). Il sera donc essentiel de mieux caractériser les lymphocytes T CD8 exprimant CD122 avant et pendant le développement de l'EAE afin d'élucider leur contribution à la pathobiologie de la maladie. Yu et collaborateurs ont aussi administré un anticorps anti-IL-10 au jour 20 après l'induction de l'EAE passive avec les CD8+ CD122+ (Yu, Bamford et al. 2014). Les scores des souris ont augmenté suite au blocage de l'IL-10 suggérant que la protection par les lymphocytes T CD8+ CD122+ est partiellement due à l'action de l'IL-10 (Yu, Bamford et al. 2014).

Selon notre stratégie d'analyse de cytométrie, les lymphocytes T CD8 exprimant le récepteur CD122 atteignaient plus de 92 % des cellules présentes dans le SNC et en périphérie pour tous les groupes analysés. Dans notre cas la population de lymphocytes T CD8+CD122- représentait une population minoritaire. Il est possible que la population CD122+ soit hétérogène. En périphérie, nos résultats montrent une augmentation de la fréquence et du nombre de lymphocytes T CD8 24 h après les injections d'IL-15 complexée, puis des niveaux similaires entre tous les groupes au pic de la maladie (environ 5-7 jours après la dernière injection du complexe IL-15). Il est possible que les lymphocytes T CD8+ CD122+ de la périphérie aient préférentiellement migré au SNC. D'autres expériences sont nécessaires afin de caractériser le phénotype et le rôle des lymphocytes T CD8 CD122+ dans notre modèle. Pour

évaluer la toxicité des lymphocytes T CD8 CD122+ dans le SNC des souris, la production de cytokines et de granzyme B doit être quantifiée par cytométrie. Pour évaluer si les lymphocytes T CD8 dans le SNC jouent un rôle régulateur, nous pourrions caractériser l'expression de l'IL-10 comme l'ont fait Yu et collaborateurs (Yu, Bamford et al. 2014). Nous pourrions aussi caractériser l'expression de molécule anti-apoptotique comme les membres de la famille Bcl2 impliqués dans la survie des lymphocytes T (Shenoy, Kirschnek et al. 2014). Pour corrélérer nos observations sur les tissus cérébraux de patients dans le modèle murin de la SEP, des analyses immunohistochimiques peuvent être envisagées pour détecter la localisation des lymphocytes T CD8+ CD122+ par rapport aux lésions dans les tissus.

Seulement la fréquence des cellules NK CD122+ tend à augmenter dans le SNC en réponse aux injections d'IL-15 complexée (figure 7 B). Le niveau d'expression du récepteur CD122 (MFI) a été constant parmi les groupes. Ce résultat est probablement dû à l'effet prolifératif de l'IL-15 sur les cellules NK. Par contre, les cellules NK CD122+ tendent à être encore plus abondantes au pic de la maladie dans le SNC dans le groupe injecté à l'IL-15 complexée (Figure 5 b), tandis qu'en périphérie la fréquence et des NK+ CD122+ tendent à être au même niveau que les groupes contrôles (Figure 12 B). Comme pour les lymphocytes T CD8, il sera nécessaire d'investiguer le rôle de ces cellules NK+ CD122+ dans le modèle EAE.

Expansion des lymphocytes T CD8 en réponse aux injections d'IL-15

L'expansion des lymphocytes T peut s'observer par l'expression du marqueur CD44 (Fortner, Bond et al. 2017). Ces lymphocytes peuvent passer par un Spectrum d'expression de ce marqueur allant de bas (low), intermédiaire (int), et fort (high). Cette nomenclature est surtout utiliser pour l'expansion homéostatique des lymphocytes T (Fortner, Bond et al. 2017). Dans le contexte de ce projet nous avons évalué l'expression du marqueur CD44 chez les lymphocytes T CD4 et CD8 en tant que marqueur d'activation/expansion en réponse aux injections d'IL-15. Nos résultats montrent que les souris qui ont été injecté à l'IL-15 ont une plus grande proportion de lymphocyte T CD8 qui sont CD44 hi comparativement aux groupes contrôles. Il semble donc que les injections d'IL-15 en périphérie ont pour effet de causer une plus grande expansion des lymphocytes T CD8 comparativement au lymphocyte T CD4. En résumé, ces résultats suggèrent que l'IL-15 contribue à l'expansion des lymphocytes T CD8 en périphérie pouvant contribuer à l'exacerbation de l'EAE.

Phénotype mémoire/effeteur des populations cellulaires après les injections d'IL-15 complexée

Afin de caractériser le phénotype des lymphocytes T dans l'EAE suite aux injections d'IL-15 complexée, nous nous sommes basés sur le modèle d'infection virale d'Obar et collaborateurs. Leur modèle utilise l'expression des marqueurs KLRG1 et CD127 pour distinguer les lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoires (Obar, Jellison et al. 2011). Dans leur modèle, l'expression de ces deux marqueurs varie au cours de l'infection. Au début de l'infection, les lymphocytes T CD8 ont un phénotype de cellules effectrices de courte longévité (SLEC ; KLRG1^{high}, CD127^{low}). Dans la phase chronique de l'infection, les lymphocytes T CD8 ont un phénotype mémoire (MPEC ; KLRG1^{low}, CD127^{high}) (Obar, Jellison et al. 2011). Plusieurs groupes utilisent aussi ces marqueurs pour différencier les cellules effectrices des cellules mémoires particulièrement pour investiguer l'épuisement des lymphocytes T CD8 dans les infections virales (Beltra, Bourbonnais et al. 2016).

Le contexte de l'auto-immunité est bien différent du contexte infectieux, cependant nous avons voulu transposer ce modèle au nôtre et voir la différence des populations basées sur KLRG1 et CD127 après les injections d'IL-15 complexée. Nos résultats n'ont pas montré d'effet concluant induits par les injections d'IL-15 complexée sur les populations de lymphocytes T CD8 dans le SNC et dans la rate (Figure 8, 9, 13, 14). Pour les lymphocytes T CD4, les résultats montrent une diminution des cellules effectrices précoces dans le SNC ce qui suggère que ces cellules peuvent être plus de types mémoire. Par contre, ce modèle est moins utilisé pour les lymphocytes T CD4.

Le groupe de Decaluwe et collaborateurs a étudié le rôle de la signalisation de l'IL-15 et l'IL-2 sur les populations de lymphocytes T CD8 (Mathieu, Beltra et al. 2015, Beltra, Bourbonnais et al. 2016). Leurs études montrent que la signalisation via la chaîne β l'IL-15 et l'IL-2 favorise la survie des lymphocytes T CD8 et leur différenciation en cellules SLEC (Mathieu, Beltra et al. 2015). Ces cellules peuvent aussi devenir épuisées lors d'une infection virale chronique et perdre leur capacité effectrice (Beltra, Bourbonnais et al. 2016). Or, dans notre modèle il n'y a pas d'effet des injections d'IL-15 sur les cellules SLEC du SNC et de la périphérie. Les lymphocytes T CD8 épuisés semblent être une population cellulaire qui exprime de hauts niveaux du récepteur CD122 et exprime plus la molécule PD-1 (Beltra, Bourbonnais et al. 2016)

. Notre stratégie d'analyse dans la périphérie semble montrer une double population de lymphocyte T CD8 exprimant CD122. Il serait intéressant d'évaluer des marqueurs de différenciation terminale comme PD-1 pour savoir si ces cellules ont le même phénotype que celles rencontrées dans le contexte d'une infection virale. Par contre, nous n'avons pas de données qui suggèrent un épuisement des lymphocytes T CD8 dans notre modèle.

Expression des cytokines en périphérie après injection d'IL-15

L'IL-15 peut induire la production de certaines cytokines par les cellules immunitaires. Dans le cadre de ce projet, trois cytokines ont été mesurées après les injections d'IL-15 complexée. Les cytokines telles que le TNF, l'IFN γ et le GM-CSF ont été mesurées seulement dans la rate. Le but était d'évaluer le profil cytokinique des lymphocytes T et des cellules NK dans la rate en réponse aux injections périphériques d'IL-15 complexée. Nos résultats montrent une tendance à l'augmentation de la production de TNF par les lymphocytes T CD8 et les cellules NK (Figure 14c) au pic de la maladie. Les lymphocytes T CD4 ont une tendance à exprimer plus davantage d'IFN γ au pic de la maladie (Figure 16 B). Toutefois, nous n'avons pas observé de changement significatif entre les groupes et entre les temps d'analyse pour le GM-CSF (Figure 16A). Cependant, il serait intéressant de voir la production de cytokines par les lymphocytes qui infiltrent le SNC aux différents temps de la maladie suite aux injections d'IL-15 complexée. Cette expérience n'a pas pu être réalisée à cause du nombre limité de cellules extraites pour chaque mélange d'anticorps de FACS. Il se pourrait que la différence soit plus notable dans le SNC que dans la rate des souris EAE injectée à l'IL-15 complexées.

GM-CSF

Le GM-CSF est une cytokine sécrétée en réponse à l'inflammation par les cellules de l'endothélium, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T activés (Sonderegger, Iezzi et al. 2008). Elle a été décrite comme un facteur de prolifération et de différenciation des macrophages et des cellules dendritiques (Sonderegger, Iezzi et al. 2008). Les études proposent que le GM-CSF cause une prolifération et une polarisation Th1 des lymphocytes T (Sonderegger, Iezzi et al. 2008). Dans l'EAE, la cytokine GM-CSF semble avoir une importante contribution à la pathogenèse du modèle. Les souris déficientes pour le GM-CSF sont incapables de développer l'EAE (McQualter, Darwiche et al. 2001) tandis que les

souris déficientes pour l'IFN γ ou l'IL-17 développent la maladie (Croxford, Spath et al. 2015). Les souris ne développent pas l'EAE dans le contexte de transfert adoptif de lymphocytes T CD4 déficients pour le GM-CSF (Croxford, Spath et al. 2015). Des études ont montré qu'il y a une grande proportion de lymphocytes T CD4 qui infiltrent le SNC et qui co-expriment l'IL-17 A et le GM-CSF. Ces observations suggèrent que les cellules Th17 productrices du GM-CSF jouent un rôle dans la pathogenèse du modèle EAE (Croxford, Spath et al. 2015). Les infiltrats de cellules immunitaires des souris déficientes pour le GM-CSF ne se maintiennent pas au cours de la maladie dans le SNC (McQualter, Darwiche et al. 2001). Un autre groupe a étudié l'implication du GM-CSF dans le SNC et a démontré que les souris transgéniques sur-exprimant le GM-CSF spécifiquement dans les lymphocytes T CD4 matures ont une infiltration cellulaire antigène-indépendante dans le SNC et ont des déficits neurologiques (Spath, Komuczki et al. 2017).

Plusieurs études ont démontré que les lymphocytes Th17 producteurs du GM-CSF représentent des cellules encéphalitogéniques dans le modèle de l'EAE (Sonderregger, Iezzi et al. 2008). Les données disponibles sur l'impact de l'IL-15 sur les lymphocytes Th17 sont contradictoires. Certains chercheurs ont montré que les souris déficientes pour l'IL-15 ont une plus grande proportion de lymphocytes Th17 dans la lamina propria de l'intestin et que les souris transgéniques surexprimant l'IL-15 exhibent une plus petite proportion de lymphocytes Th17 à cet endroit (Yu, Sui et al. 2015). Padiyan et collaborateurs ont induit l'EAE chez des souris déficientes en IL-15 et montré que les injections d'IL-15 sont bénéfiques dans la pathogenèse de l'EAE en inhibant les Th17 délétères dans la maladie (Pandiyani, Yang et al. 2012). Les souris déficientes pour l'IL-15 ou l'IL-15R α semblent développer de façon spontanée, mais tardive de l'auto-immunité. Ces souris présentaient une sélection négative des lymphocytes T dans le thymus altéré laissant échapper un plus grand nombre de lymphocytes T CD4 producteur d'IL-17A en périphérie (Hou, Huang et al. 2015). En contrepartie, d'autres études dans des modèles de la maladie de cœliaque et dans des cultures cellulaires déficientes en IL-15 ont montré que l'IL-15 inhibe la polarisation des lymphocytes T CD4 en Th17 (Chen, Chauhan et al. 2017) (Harris, Fasano et al. 2010). En résumé, la littérature est conflictuelle au sujet de l'impact de l'IL-15 sur la polarisation de lymphocytes Th17 ; les contextes inflammatoires pourraient jouer un grand rôle dans ces mécanismes.

Afin de mesurer la production de cytokines par les cellules de la rate, les splénocytes ont été stimulés *in vitro* en présence de la PMA, de l'Ionomycine et de la BFA. Un autre protocole a été récemment optimisé dans notre laboratoire pour la détection de la production de cytokine. Dans ce protocole la BFA est injectée par voie IP chez les souris. Celles-ci sont euthanasiées cinq heures après l'injection et les cellules n'ont pas besoin de re-stimulation *in vitro*. Cette méthode est plus représentative de la production de cytokine au moment du décès de l'animal. De plus, il serait intéressant de mesurer la production de cette cytokine dans le SNC. L'IL-17 serait aussi une cytokine à détecter dans le SNC et en périphérie afin de déterminer le rôle des injections d'IL-15 sur la réponse Th17 dans l'EAE.

TNF

Le TNF est aussi une cytokine d'intérêt dans la SEP et l'EAE (Imitola, Chitnis et al. 2005). Cette cytokine pro-inflammatoire est produite par les lymphocytes T CD8, les Th1 activés, les macrophages, les cellules NK, les astrocytes et les microglies (Trenova, Slavov et al. 2017). L'expression de cette cytokine est corrélée avec le développement du modèle EAE et est mesurée en plus grande quantité dans le sérum et le CSF des patients atteints de la SEP (Trenova, Slavov et al. 2017). Cette cytokine est associée avec une réponse Th1 et elle induit l'activation de plusieurs types cellulaires et la production de chimiokine (Imitola, Chitnis et al. 2005). Des injections de TNF causent une prolongation de l'EAE et une augmentation des infiltrations cellulaires dans la moelle épinière (Imitola, Chitnis et al. 2005). Le TNF dans le SNC joue un rôle dans la démyélinisation et l'apoptose des oligodendrocytes (Karamita, Barnum et al. 2017). Le TNF induit aussi l'apoptose des précurseurs d'oligodendrocytes. Chez les patients SEP, le TNF est surexprimé dans les lésions et est exprimé par les macrophages, les microglies et les astrocytes (Imitola, Chitnis et al. 2005). Il y a aussi une corrélation positive avec les poussées.

Nos résultats tendent à montrer une augmentation de la production cytokinique par les lymphocytes T CD8 et des cellules NK au pic de la maladie en réponse aux injections d'IL-15 complexée. Nous avons seulement évalué l'expression de cette cytokine sur les lymphocytes T CD4, CD8 et les cellules NK. Comme cette cytokine est aussi exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes et certaines cellules gliales, il serait intéressant de voir l'expression

du TNF sur ces autres populations cellulaires dans le SNC après les injections d'IL-15 complexée.

Comme déjà mentionné, le TNF est connu pour être impliqué dans la démyélinisation dans le modèle de l'EAE(Karamita, Barnum et al. 2017). Cependant, une étude contredit ce phénomène. En effet, il a été montré que le TNF a des fonctions régulatrices dans la remyélinisation dans le modèle de démyélinisation utilisant le cuprizone (Karamita, Barnum et al. 2017). Ces études ont mis en évidence le système de ligands du TNF. Le TNF possède deux récepteurs (TNFR1 et TNFR2) dont l'un d'eux (TNFR2) favorise la remyélinisation et la prolifération des précurseurs d'oligodendrocytes après l'arrêt du cuprizone (Arnett, Mason et al. 2001, Karamita, Barnum et al. 2017). En effet, l'essai clinique utilisant un agent bloquant le TNF chez les patients atteints de la SEP a dû être rapidement stoppé à cause d'une augmentation des symptômes chez ces patients(Van Oosten, Barkhof et al. 1996). De plus, les agents bloquants utilisés pour traiter d'autres maladies inflammatoires (e.g. maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde, etc.) peuvent causer de la démyélinisation dans le SNC de ces patients traités(Ali and Laughlin 2017).

Dans le cadre de ce projet, des tissus du SNC et de la rate de souris injectées à l'IL-15 complexée ont été récupérés et sont conservés à -80 °C . Il serait intéressant de corrélérer l'expression du TNF par les différents types cellulaires (immunitaires et neurales) avec le degré de démyélinisation des lésions chez les souris qui ont été injectées avec l'IL-15 complexée à différents stades de la maladie.

L'IFN γ

L'IFN γ joue un rôle important dans le contexte de la SEP et du modèle EAE. Cette cytokine est sécrétée par les lymphocytes T, les cellules NK et est un marqueur du phénotype Th1. L'IFN γ joue un rôle dans l'apoptose des cellules (Imitola, Chitnis et al. 2005). Cette cytokine est exprimée à plusieurs stades de l'EAE et son expression augmente au pic de la maladie (Imitola, Chitnis et al. 2005). La surexpression de cette cytokine occasionne une démyélinisation progressive dans l'EAE. Contre toute attente, un blocage de cette cytokine provoque une EAE encore plus sévère (Imitola, Chitnis et al. 2005). Les études suggèrent que les effets anti-prolifératifs de l'IFN γ sur les lymphocytes T et son impact sur l'apoptose seraient impliqués. De plus, le blocage de l'IFN γ a permis l'augmentation de lymphocytes Th17 encéphalitogéniques

dans le modèle EAE (Damsker, Hansen et al. 2010). Chez les patients atteints de la SEP, la concentration de l'IFN γ corrèle avec les poussées. De plus une étude clinique ancienne avait démontré que des injections d'IFN γ peuvent précipiter des poussées chez les patients atteints de la SEP (Panitch, Hirsch et al. 1987, Imitola, Chitnis et al. 2005). L'IFN γ peut augmenter la pathobiologie de la SEP mais peut aussi freiner le développement de populations lymphocytaires aussi encéphalitogéniques (Th17).

Les cellules NK sont connues comme de bonnes productrices d'IFN γ (Spallanzani, Torres et al. 2015). Elles ont une communication serrée avec les cellules dendritiques et ceci nécessite la sécrétion de cytokines telle que l'IL-15 (Spallanzani, Torres et al. 2015). Il est plutôt établi dans la littérature que l'IL-15 joue un rôle dans la prolifération des cellules NK les rendant aussi plus cytotoxiques en stimulant la production d'IFN γ (Spallanzani, Torres et al. 2015). Nos résultats obtenus dans le SNC des souris EAE injectées à l'IL-15 complexée montrent une tendance à l'augmentation de la fréquence des cellules NK qui infiltrent le SNC et dans la périphérie. L'IL-15 injectée aux souris a donc eu un effet, du moins significatif en périphérie, sur les cellules NK. Toutefois, nous n'avons pas observé de changement significatif de l'expression de l'IFN γ (mesuré dans la rate même s'il était attendu que cette population cellulaire chez les souris injectées à l'IL-15 a une plus grande proportion de cellules positives pour l'IFN γ). Il serait intéressant de regarder l'expression de l'IFN γ dans les cellules NK qui ont infiltré le SNC.

Conclusion :

Pour finir, le but de ce projet était de démontrer l'effet d'une élévation d'IL-15 en périphérie sur le développement de l'EAE. Puisque les concentrations d'IL-15 sont plus élevées dans le sang des patients SEP, nous voulions comprendre la biologie derrière cette observation. Nous avons utilisé le modèle EAE puisque ce modèle mimique certains aspects de la maladie SEP. Contrairement à la littérature, les injections d'IL-15 ont augmenté la sévérité de l'EAE et semblent jouer sur les différentes populations de cellules immunitaires dans le SNC et la rate.

D'autres expériences restent à faire pour mieux caractériser le rôle de l'IL-15 dans la pathogenèse de l'EAE, mais les résultats présentés donnent un aperçu de son rôle. Finalement, l'IL-15 est une cible pour les thérapies du cancer (Rautela and Huntington 2016) et de plus en plus pour les maladies inflammatoires (Cheung and McInnes 2017). En comprenant mieux la signalisation et son impact sur les cellules pathogéniques, peut-être pourrions-nous trouver une cible afin de prévenir les poussées ou ralentir le développement de la SEP.

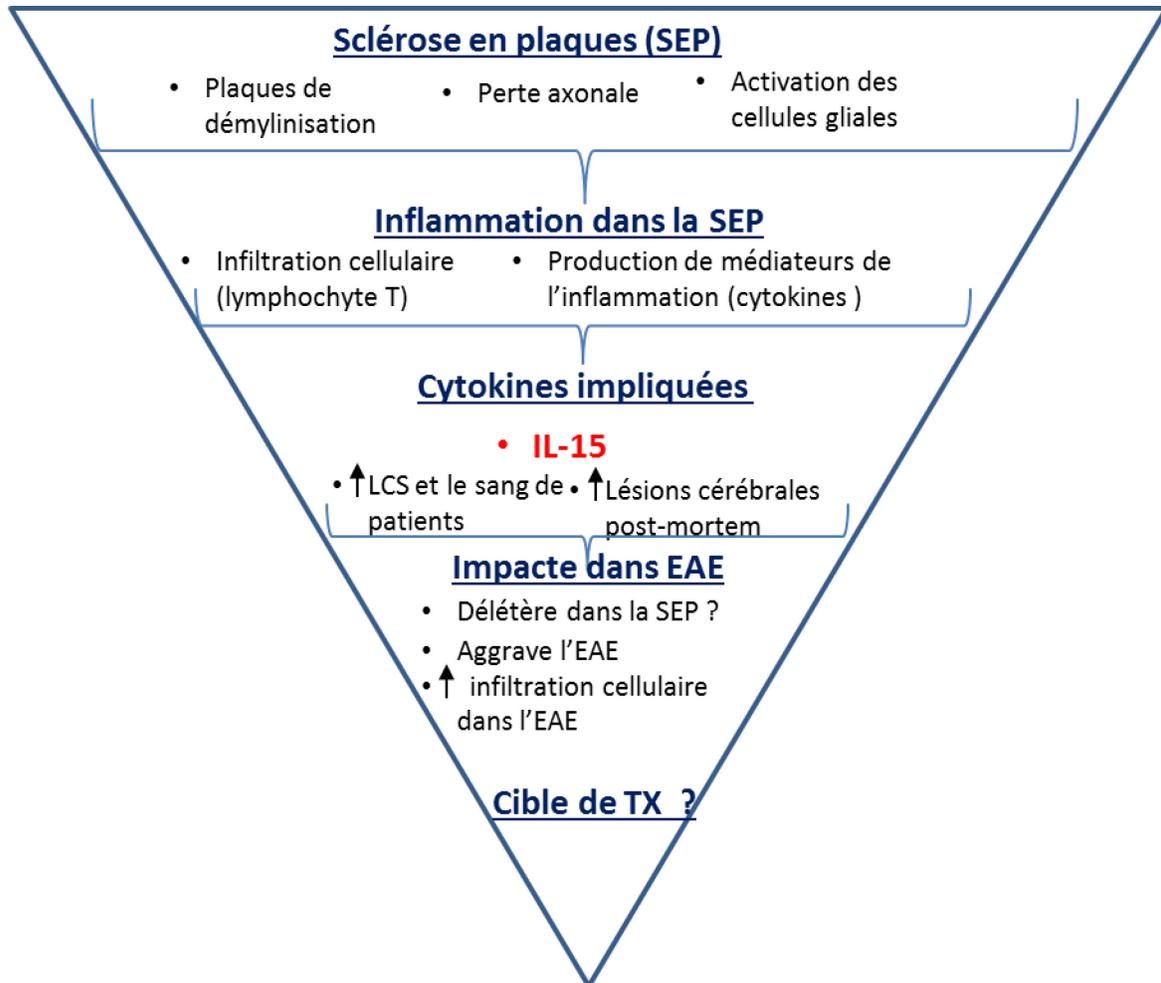


Figure 18 : figure récapitulative

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. (2003). "The control of T cell activation vs. tolerance." Autoimmun Rev **2**(3): 115-118.

Ali, F. and R. S. Laughlin (2017). "Asymptomatic CNS demyelination related to TNF- α inhibitor therapy." Neurology-Neuroimmunology Neuroinflammation **4**(1): e298.

Alonso, A. and M. A. Hernán (2008). "Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis A systematic review." Neurology **71**(2): 129-135.

Anderson, D. M., L. Johnson, M. B. Glaccum, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, V. Valentine, M. N. Kirstein, D. N. Shapiro, S. W. Morris and et al. (1995). "Chromosomal assignment and genomic structure of Il15." Genomics **25**(3): 701-706.

Anderson, D. M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins and et al. (1995). "Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes." J Biol Chem **270**(50): 29862-29869.

Arnett, H. A., J. Mason, M. Marino, K. Suzuki, G. K. Matsushima and J. P. Ting (2001). "TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination." Nat Neurosci **4**(11): 1116-1122.

Bamford, R. N., A. P. DeFilippis, N. Azimi, G. Kurys and T. A. Waldmann (1998). "The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control." J Immunol **160**(9): 4418-4426.

Bashinskaya, V. V., O. G. Kulakova, A. N. Boyko, A. V. Favorov and O. O. Favorova (2015). "A review of genome-wide association studies for multiple sclerosis: classical and hypothesis-driven approaches." Hum Genet **134**(11-12): 1143-1162.

Beltra, J. C., S. Bourbonnais, N. Bedard, T. Charpentier, M. Boulange, E. Michaud, I. Boufaied, J. Bruneau, N. H. Shoukry, A. Lamarre and H. Decaluwe (2016). "IL2Rbeta-dependent signals drive terminal exhaustion and suppress memory development during chronic viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(37): E5444-5453.

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.

- 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.
- Bixler, S. L. and A. J. Goff (2015). "The Role of Cytokines and Chemokines in Filovirus Infection." Viruses **7**(10): 5489-5507.
- Brynedal, B., K. Duvefelt, G. Jonasdottir, I. M. Roos, E. Akesson, J. Palmgren and J. Hillert (2007). "HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis." PLoS One **2**(7): e664.
- Castillo, E. F. and K. S. Schluns (2012). "Regulating the immune system via IL-15 transpresentation." Cytokine **59**(3): 479-490.
- Cerwenka, A. and L. L. Lanier (2001). "Natural killer cells, viruses and cancer." Nat Rev Immunol **1**(1): 41-49.
- Chen, Y., S. K. Chauhan, X. Tan and R. Dana (2017). "Interleukin-7 and -15 maintain pathogenic memory Th17 cells in autoimmunity." J Autoimmun **77**: 96-103.
- Cheung, T. T. and I. B. McInnes (2017). Future therapeutic targets in rheumatoid arthritis? *Seminars in Immunopathology*, Springer.
- Cho, M. L., J. H. Ju, K. W. Kim, Y. M. Moon, S. Y. Lee, S. Y. Min, Y. G. Cho, H. S. Kim, K. S. Park, C. H. Yoon, S. H. Lee, S. H. Park and H. Y. Kim (2007). "Cyclosporine A inhibits IL-15-induced IL-17 production in CD4+ T cells via down-regulation of PI3K/Akt and NF-kappaB." Immunol Lett **108**(1): 88-96.
- Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman and C. Terhorst (1988). "The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble." Annual review of immunology **6**(1): 629-662.
- Cortese, I. and A. Nath (2017). *Immunomodulatory Therapy for Multiple Sclerosis. Neuroimmune Pharmacology*, Springer: 713-736.
- Croxford, A. L., S. Spath and B. Becher (2015). "GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage." Trends Immunol **36**(10): 651-662.
- Curtis, M. M. and S. S. Way (2009). "Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens." Immunology **126**(2): 177-185.
- Damsker, J. M., A. M. Hansen and R. R. Caspi (2010). "Th1 and Th17 cells." Annals of the New York Academy of Sciences **1183**(1): 211-221.

De, A. K., K. Laudanski and C. L. Miller-Graziano (2003). "Failure of monocytes of trauma patients to convert to immature dendritic cells is related to preferential macrophage-colony-stimulating factor-driven macrophage differentiation." J Immunol **170**(12): 6355-6362.

Delves, P. J. and I. M. Roitt (2000). "The immune system." New England journal of medicine **343**(1): 37-49.

Di Scala, M., I. Gil-Farina, C. Olague, A. Vales, L. Sobrevals, P. Fortes, D. Corbacho and G. Gonzalez-Aseguinolaza (2016). "Identification of IFN-gamma-producing T cells as the main mediators of the side effects associated to mouse interleukin-15 sustained exposure." Oncotarget **7**(31): 49008-49026.

Dos Passos, G. R., D. K. Sato, J. Becker and K. Fujihara (2016). "Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications." Mediators Inflamm **2016**: 5314541.

Dubois, S., F. Magrangeas, P. Lehours, S. Raheer, J. Bernard, O. Boisteau, S. Leroy, S. Minvielle, A. Godard and Y. Jacques (1999). "Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression." J Biol Chem **274**(38): 26978-26984.

Dyment, D. A., G. C. Ebers and A. D. Sadovnick (2004). "Genetics of multiple sclerosis." Lancet Neurol **3**(2): 104-110.

El Kassar, N., P. J. Lucas, D. B. Klug, M. Zamisch, M. Merchant, C. V. Bare, B. Choudhury, S. O. Sharrow, E. Richie and C. L. Mackall (2004). "A dose effect of IL-7 on thymocyte development." Blood **104**(5): 1419-1427.

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.

Elpek, K. G., M. P. Rubinstein, A. Bellemare-Pelletier, A. W. Goldrath and S. J. Turley (2010). "Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15Ralpha complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21647-21652.

Eskandarieh, S., P. Heydarpour, A. Minagar, S. Pourmand and M. A. Sahraian (2016). "Multiple Sclerosis Epidemiology in East Asia, South East Asia and South Asia: A Systematic Review." Neuroepidemiology **46**(3): 209-221.

Eskandarieh, S., P. Heydarpour, A. Minagar, S. Pourmand and M. A. Sahraian (2016). "Multiple Sclerosis Epidemiology in East Asia, South East Asia and South Asia: A Systematic Review." Neuroepidemiology **46**(3): 209-221.

Fehniger, T. A. and M. A. Caligiuri (2001). "Interleukin 15: biology and relevance to human disease." Blood **97**(1): 14-32.

Ferretti, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones and A. Trifilieff (2003). "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger." J Immunol **170**(4): 2106-2112.

Finkelman, F. D., K. B. Madden, S. C. Morris, J. M. Holmes, N. Boiani, I. M. Katona and C. R. Maliszewski (1993). "Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes." J Immunol **151**(3): 1235-1244.

Fleming, K. K., J. A. Bovaird, M. C. Mosier, M. R. Emerson, S. M. LeVine and J. G. Marquis (2005). "Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **170**(1-2): 71-84.

Fortner, K. A., J. P. Bond, J. W. Austin, J. M. Boss and R. C. Budd (2017). "The molecular signature of murine T cell homeostatic proliferation reveals both inflammatory and immune inhibition patterns." J Autoimmun **82**: 47-61.

Fuchs, A., W. Vermi, J. S. Lee, S. Lonardi, S. Gilfillan, R. D. Newberry, M. Cella and M. Colonna (2013). "Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells." Immunity **38**(4): 769-781.

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.

Garcia, V. E., D. Jullien, M. Song, K. Uyemura, K. Shuai, C. T. Morita and R. L. Modlin (1998). "IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpeptide] microbial antigens." J Immunol **160**(9): 4322-4329.

Goldenberg, M. M. (2012). "Multiple sclerosis review." PT **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, D. W. Pita-Thomas and M. Nieto-Sampedro (2008). "Interleukin 15 expression in the CNS: blockade of its activity prevents glial activation after an inflammatory injury." Glia **56**(5): 494-505.

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.

Gómez-Nicola, D., B. Valle-Argos, M. Suardiáz, 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." Journal of neurochemistry **107**(6): 1741-1752.

Gross, C. C., A. Schulte-Mecklenbeck, A. Rünzi, T. Kuhlmann, A. Posevitz-Fejfar, N. Schwab, T. Schneider-Hohendorf, S. Herich, K. Held and M. Konjević (2016). "Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation." Proceedings of the National Academy of Sciences: 201524924.

Gutcher, I. and B. Becher (2007). "APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation." Journal of Clinical Investigation **117**(5): 1119-1127.

Hampl, J., Y. H. Chien and M. M. Davis (1997). "CD4 augments the response of a T cell to agonist but not to antagonist ligands." Immunity **7**(3): 379-385.

Harris, K. M., A. Fasano and D. L. Mann (2010). "Monocytes differentiated with IL-15 support Th17 and Th1 responses to wheat gliadin: implications for celiac disease." Clin Immunol **135**(3): 430-439.

Hawkes, C. H. (2007). "Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis." Multiple sclerosis.

He, Y., H. Hsuchou, X. Wu, A. J. Kastin, R. S. Khan, P. J. Pistell, W. H. Wang, J. Feng, Z. Li, X. Guo and W. Pan (2010). "Interleukin-15 receptor is essential to facilitate GABA transmission and hippocampal-dependent memory." J Neurosci **30**(13): 4725-4734.

Hou, M. S., S. T. Huang, M. H. Tsai, C. C. Yen, Y. G. Lai, Y. H. Liou, C. K. Lin and N. S. Liao (2015). "The interleukin-15 system suppresses T cell-mediated autoimmunity by regulating negative selection and nT(H)17 cell homeostasis in the thymus." J Autoimmun **56**: 118-129.

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.

Hsuchou, H., W. Pan, X. Wu and A. J. Kastin (2009). "Cessation of blood-to-brain influx of interleukin-15 during development of EAE." J Cereb Blood Flow Metab **29**(9): 1568-1578.

Huang, Y. S., S. N. Cheng, S. H. Chueh, Y. L. Tsai, N. H. Liou, Y. W. Guo, M. H. Liao, L. H. Shen, C. C. Chen, J. C. Liu and K. H. Ma (2009). "Effects of interleukin-15 on neuronal differentiation of neural stem cells." Brain Res **1304**: 38-48.

Imitola, J., T. Chitnis and S. J. Khoury (2005). "Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside." Pharmacol Ther **106**(2): 163-177.

Ivanov, I. I., K. Atarashi, N. Manel, E. L. Brodie, T. Shima, U. Karaoz, D. Wei, K. C. Goldfarb, C. A. Santee and S. V. Lynch (2009). "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria." Cell **139**(3): 485-498.

Ivanova, E. A. and A. N. Orekhov (2015). "T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview." Biomed Res Int **2015**: 327470.

Jabri, B. and V. Abadie (2015). "IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction." Nat Rev Immunol **15**(12): 771-783.

Karamita, M., C. Barnum, W. Mobius, M. G. Tansey, D. E. Szymkowski, H. Lassmann and L. Probert (2017). "Therapeutic inhibition of soluble brain TNF promotes remyelination by increasing myelin phagocytosis by microglia." JCI Insight **2**(8).

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.

Kennedy, M., D. Torrance, K. Picha and K. Mohler (1992). "Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery." The Journal of Immunology **149**(7): 2496-2505.

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.

Kennel, S. J., T. K. Lankford, L. J. Foote, S. G. Shinpock and C. Stringer (1993). "CD44 expression on murine tissues." J Cell Sci **104** (Pt 2): 373-382.

Kidd, P. (2003). "Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease." Altern Med Rev **8**(3): 223-246.

Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen and K. A. Hogquist (2014). "Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)." Nat Rev Immunol **14**(6): 377-391.

Kleinewietfeld, M. and D. A. Hafler (2014). "Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation." Immunol Rev **259**(1): 231-244.

Kocovska, E., F. Gaughran, A. Krivoy and U. C. Meier (2017). "Vitamin-D Deficiency As a Potential Environmental Risk Factor in Multiple Sclerosis, Schizophrenia, and Autism." Front Psychiatry **8**: 47.

Krause, H., B. Jandrig, C. Wernicke, S. Bulfone-Paus, T. Pohl and T. Diamantstein (1996). "Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15)." Cytokine **8**(9): 667-674.

Kuhlmann, T., S. Ludwin, A. Prat, J. Antel, W. Bruck and H. Lassmann (2017). "An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions." Acta Neuropathol **133**(1): 13-24.

Kwon, H. J., N. Kim and H. S. Kim (2017). "Molecular checkpoints controlling natural killer cell activation and their modulation for cancer immunotherapy." Exp Mol Med **49**(3): e311.

Labrecque, N., T. Baldwin and S. Lesage (2011). "Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection." Immunol Cell Biol **89**(1): 16-26.

Lassmann, H. (2004). "Recent neuropathological findings in MS--implications for diagnosis and therapy." J Neurol **251 Suppl 4**: Iv2-5.

Lassmann, H. and M. Bradl (2017). "Multiple sclerosis: experimental models and reality." Acta Neuropathol **133**(2): 223-244.

Legroux, L. and N. Arbour (2015). "Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story." J Neuroimmune Pharmacol **10**(4): 528-546.

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.

Lodolce, J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin and A. Ma (1998). "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation." Immunity **9**(5): 669-676.

Lowther, D. E. and D. A. Hafler (2012). "Regulatory T cells in the central nervous system." Immunol Rev **248**(1): 156-169.

Luescher, I. F., E. Vivier, A. Layer, J. Mahiou, F. Godeau, B. Malissen and P. Romero (1995). "CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes." Nature **373**(6512): 353-356.

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.

Mathieu, C., J. C. Beltra, T. Charpentier, S. Bourbonnais, J. P. Di Santo, A. Lamarre and H. Decaluwe (2015). "IL-2 and IL-15 regulate CD8+ memory T-cell differentiation but are dispensable for protective recall responses." Eur J Immunol **45**(12): 3324-3338.

Matsumoto, Y., K. Kohyama, Y. Aikawa, T. Shin, Y. Kawazoe, Y. Suzuki and N. Tanuma (1998). "Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis." Eur J Immunol **28**(5): 1681-1688.

McCarthy, D. P., M. H. Richards and S. D. Miller (2012). "Mouse Models of Multiple Sclerosis: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Theiler's Virus-Induced Demyelinating Disease." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **900**: 381-401.

McGeer, P. L., T. Kawamata, D. G. Walker, H. Akiyama, I. Tooyama and E. G. McGeer (1993). "Microglia in degenerative neurological disease." Glia **7**(1): 84-92.

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.

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." Journal of Experimental Medicine **194**(7): 873-882.

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.

Mills, E. A., A. Mirza and Y. Mao-Draayer (2017). "Emerging Approaches for Validating and Managing Multiple Sclerosis Relapse." Front Neurol **8**: 116.

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.

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.

Murray, R., T. Suda, N. Wrighton, F. Lee and A. Zlotnik (1989). "IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets." International Immunology **1**(5): 526-531.

Nishimura, H., K. Hiromatsu, N. Kobayashi, K. H. Grabstein, R. Paxton, K. Sugamura, J. A. Bluestone and Y. Yoshikai (1996). "IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection." J Immunol **156**(2): 663-669.

Obar, J. J., E. R. Jellison, B. S. Sheridan, D. A. Blair, Q. M. Pham, J. M. Zickovich and L. Lefrancois (2011). "Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8⁺ T cell differentiation." J Immunol **187**(10): 4967-4978.

Ota, K., M. Matsui, E. L. Milford, G. A. Mackin, H. L. Weiner and D. A. Hafler (1990). "T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis." Nature **346**(6280): 183-187.

Pagliari, D., R. Cianci, S. Frosali, R. Landolfi, G. Cammarota, E. E. Newton and F. Pandolfi (2013). "The role of IL-15 in gastrointestinal diseases: A bridge between innate and adaptive immune response." Cytokine Growth Factor Rev: doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.1005.1004.

Pagliari, D., R. Cianci, S. Frosali, R. Landolfi, G. Cammarota, E. E. Newton and F. Pandolfi (2013). "The role of IL-15 in gastrointestinal diseases: a bridge between innate and adaptive immune response." Cytokine Growth Factor Rev **24**(5): 455-466.

Pan, W., X. Wu, A. J. Kastin, Y. Zhang, H. Hsueh, F. Halberg, F. Chatu, R. S. Khan, B. Robert and G. G. Cornelissen-Guillaume (2011). "Potential protective role of IL15/Ralpha during inflammation." J Mol Neurosci **43**(3): 412-423.

Pandiyar, P., X. P. Yang, S. S. Saravanamuthu, L. Zheng, S. Ishihara, J. J. O'Shea and M. J. Lenardo (2012). "The role of IL-15 in activating STAT5 and fine-tuning IL-17A production in CD4 T lymphocytes." J Immunol **189**(9): 4237-4246.

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): 1097-1097.

Parisi, L., B. Bassani, M. Tremolati, E. Gini, G. Farronato and A. Bruno (2017). "Natural Killer Cells in the Orchestration of Chronic Inflammatory Diseases." Journal of Immunology Research **2017**.

Patidar, M., N. Yadav and S. K. Dalai (2016). "Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy." Cytokine & Growth Factor Reviews **31**: 49-59.

Patidar, M., N. Yadav and S. K. Dalai (2016). "Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy." Cytokine Growth Factor Rev **31**: 49-59.

Pistilli, E. E., S. Bogdanovich, F. Garton, N. Yang, J. P. Gulbin, J. D. Conner, B. G. Anderson, L. S. Quinn, K. North, R. S. Ahima and T. S. Khurana (2011). "Loss of IL-15 receptor alpha alters the endurance, fatigability, and metabolic characteristics of mouse fast skeletal muscles." J Clin Invest **121**(8): 3120-3132.

Pollard, C., S. De Koker, X. Saelens, G. Vanham and J. Grooten (2013). "Challenges and advances towards the rational design of mRNA vaccines." Trends Mol Med **19**(12): 705-713.

Prinz, M., U. K. Hanisch, H. Kettenmann and F. Kirchhoff (1998). "Alternative splicing of mouse IL-15 is due to the use of an internal splice site in exon 5." Brain Res Mol Brain Res **63**(1): 155-162.

Ramagopalan, S. V., R. Dobson, U. C. Meier and G. Giovannoni (2010). "Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways." Lancet Neurol **9**(7): 727-739.

Ranson, T., C. A. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, W. Muller and J. P. Di Santo (2003). "IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis." Blood **101**(12): 4887-4893.

Ranson, T., C. A. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, W. Müller and J. P. Di Santo (2003). "IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis." Blood **101**(12): 4887-4893.

Rautela, J. and N. D. Huntington (2016). "IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **44**: 1-6.

Rentzos, M., C. Cambouri, A. Rombos, C. Nikolaou, M. Anagnostouli, A. Tsoutsou, A. Dimitrakopoulos, N. Triantafyllou and D. Vassilopoulos (2006). "IL-15 is elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis." J Neurol Sci **241**(1-2): 25-29.

Rentzos, M. and A. Rombos (2012). "The role of IL-15 in central nervous system disorders." Acta Neurol Scand **125**(2): 77-82.

Ronchi, F., C. Basso, S. Preite, A. Reboldi, D. Baumjohann, L. Perlini, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2016). "Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 [beta] production by myeloid cells." Nature communications **7**.

Rubinstein, M. P., M. Kovar, J. F. Purton, J. H. Cho, O. Boyman, C. D. Surh and J. Sprent (2006). "Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R {alpha}." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 9166-9171.

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.

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.

Sarkar, S., V. Kalia, W. N. Haining, B. T. Konieczny, S. Subramaniam and R. Ahmed (2008). "Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates." J Exp Med **205**(3): 625-640.

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.

Schnupf, P., V. Gaboriau-Routhiau, M. Gros, R. Friedman, M. Moya-Nilges, G. Nigro, N. Cerf-Bensussan and P. J. Sansonetti (2015). "Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro." Nature **520**(7545): 99-103.

Shenoy, A. R., S. Kirschnek and G. Hacker (2014). "IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells." Eur J Immunol **44**(8): 2500-2507.

Shi, G., C. A. Cox, B. P. Vistica, C. Tan, E. F. Wawrousek and I. Gery (2008). "Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells." J Immunol **181**(10): 7205-7213.

Silva, S. L., A. S. Albuquerque, P. Matoso, B. Charmeteau-de-Muylder, R. Cheynier, D. Ligeiro, M. Abecasis, R. Anjos, J. T. Barata and R. M. Victorino (2017). "il-7-induced Proliferation of human naive cD4 T-cells relies on continued Thymic activity." Frontiers in immunology **8**.

Sonderegger, I., G. Iezzi, R. Maier, N. Schmitz, M. Kurrer and M. Kopf (2008). "GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival." J Exp Med **205**(10): 2281-2294.

Spallanzani, R. G., N. I. Torres, D. E. Avila, A. Ziblat, X. L. Iraolagoitia, L. E. Rossi, C. I. Domaica, M. B. Fuertes, G. A. Rabinovich and N. W. Zwirner (2015). "Regulatory Dendritic Cells Restrain NK Cell IFN-gamma Production through Mechanisms Involving NKp46, IL-10, and MHC Class I-Specific Inhibitory Receptors." J Immunol **195**(5): 2141-2148.

Spath, S., J. Komuczki, M. Hermann, P. Pelczar, F. Mair, B. Schreiner and B. Becher (2017). "Dysregulation of the Cytokine GM-CSF Induces Spontaneous Phagocyte Invasion and Immunopathology in the Central Nervous System." Immunity **46**(2): 245-260.

Starr, T. K., S. C. Jameson and K. A. Hogquist (2003). "Positive and negative selection of T cells." Annu Rev Immunol **21**: 139-176.

Stoklasek, T. A., K. S. Schluns and L. Lefrancois (2006). "Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo." J Immunol **177**(9): 6072-6080.

Strauss, S., J. Bauer, U. Ganter, U. Jonas, M. Berger and B. Volk (1992). "Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients." Lab Invest **66**(2): 223-230.

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.

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.

Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg and C. D. Surh (2001). "IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(15): 8732-8737.

Trenova, A. G., G. S. Slavov, M. G. Manova, M. N. Draganaova-Filipova, N. G. Mateva, L. D. Miteva and S. A. Stanilova (2017). "Alterations in serum levels of IL-17 in contrast to TNF-alpha correspond to disease-modifying treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis." Scand J Clin Lab Invest: 1-6.

Van den Bergh, J. M., E. Lion, V. F. Van Tendeloo and E. L. Smits (2017). "IL-15 receptor alpha as the magic wand to boost the success of IL-15 antitumor therapies: The upswing of IL-15 transpresentation." Pharmacol Ther **170**: 73-79.

Van Oosten, B., F. Barkhof, L. Truyen, J. Boringa, F. Bertelsmann, B. Von Blomberg, J. Woody, H.-P. Hartung and C. Polman (1996). "Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2." Neurology **47**(6): 1531-1534.

Vandenabeele, P. and W. Fiers (1991). "Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1-/IL-6-mediated 'acute phase response' in the brain?" Immunol Today **12**(7): 217-219.

Waldmann, T. A. (2014). "Interleukin-15 in the treatment of cancer." Expert Rev Clin Immunol **10**(12): 1689-1701.

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.

Winkler-Pickett, R., H. A. Young, J. M. Cherry, J. Diehl, J. Wine, T. Back, W. E. Bere, A. T. Mason and J. R. Ortaldo (2008). "In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses." J Immunol **180**(7): 4495-4506.

Wu, G. F. and E. Alvarez (2011). "The immunopathophysiology of multiple sclerosis." Neurol Clin **29**(2): 257-278.

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.

Yang, X. K., W. D. Xu, R. X. Leng, Y. Liang, Y. Y. Liu, X. Y. Fang, C. C. Feng, R. Li, H. Cen, H. F. Pan and D. Q. Ye (2015). "Therapeutic potential of IL-15 in rheumatoid arthritis." Hum Immunol **76**(11): 812-818.

Yu, H., Y. Sui, Y. Wang, N. Sato, B. Frey, Z. Xia, T. A. Waldmann and J. Berzofsky (2015). "Interleukin-15 Constrains Mucosal T Helper 17 Cell Generation: Influence of Mononuclear Phagocytes." PLoS One **10**(11): e0143001.

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.

Zhang, B., T. Yamamura, T. Kondo, M. Fujiwara and T. Tabira (1997). "Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells." J Exp Med **186**(10): 1677-1687.

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.

Zorn, E., M. Mohseni, H. Kim, F. Porcheray, A. Lynch, R. Bellucci, C. Canning, E. P. Alyea, R. J. Soiffer and J. Ritz (2009). "Combined CD4+ donor lymphocyte infusion and low-dose recombinant IL-2 expand FOXP3+ regulatory T cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Biology of Blood and Marrow Transplantation **15**(3): 382-388.