

Université de Montréal

**Expression des SOCS-1 et SOCS-3 par les lymphocytes T humains en
réponse à des cytokines immuno-modulatrices**

par

Lama El-Khoury

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en microbiologie et immunologie

Juillet, 2009

© Lama El-Khoury, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Expression des SOCS-1 et SOCS-3 par les lymphocytes T humains en
réponse à des cytokines immuno-modulatrices**

présenté par :

Lama El-Khoury

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Johanne Poudrier

Président-rapporteur

Dr. Nathalie Arbour

Directrice de recherche

Dr. Nathalie Grandvaux

Membre du jury

Remerciements

J'éprouve une reconnaissance toute spéciale envers ma directrice de recherche, Dr Nathalie Arbour d'avoir accepté de me guider dans ces deux années de maîtrise. Sa grande disponibilité, son professionnalisme et la qualité de son encadrement ont été d'un immense secours tout au long de mes études. Je tiens aussi à souligner sa bonne humeur et son soutien qui ont souvent désamorcé les moments d'incertitudes ou de doutes. En plus de ces compétences en tant que chercheur, ses qualités d'enseignante m'ont permis d'acquérir des connaissances et des habiletés qui me seront grandement utiles dans mes activités professionnelles.

Je voudrais également remercier notre assistante de recherche, Diane Beauseigle pour sa patience et pour son précieux support technique; sans elle la tâche m'aurait paru insurmontable.

Un grand merci à mes compagnons d'armes au laboratoire ; Teodora Yaneva, Dr Raphaël Schneider, Camille Pittet et Dr Emilie Viel pour leur amitié, leur sens de l'humour, leur support, ainsi que pour les discussions fort agréables que nous avons eues.

Je ne pourrais passer sous silence la plaisante collaboration avec l'équipe du Dr Alexandre Prat. Je remercie sincèrement Monique Bernard, Lyne Bourbonnière, Igal Ifergan, Hania Kébir, Romain Cayrol, Aurore Dodelet-Devillers, Connie Podjaski, Dr Mike Sabbagh, Simone Terouz et Dr Jorge Alvarez pour les moments de joies et d'enthousiasme.

Merci à vous tous!

Dédicaces

A ma mère, *Samia*, l'étoile qui illumine ma vie qui m'a appris l'art de la patience et du courage.

A mon père, *Samir*, qui a toujours cru en moi et qui m'a appris d'aller jusqu'au bout de mes rêves.

A mes deux sœurs adorées, *Rouba* et *Christina*, pour nos moments de folies inoubliables et de nos tristesses que nous avons surmontées ensemble.

*« Écoute ton cœur, il connaît toutes choses
parce qu'il vient de l'Âme du Monde et
qu'un jour, il y retournera »*

Paulo Coelho- L'Alchimiste

*« Quand tu veux quelque chose, tout l'Univers
conspire à te permettre de réaliser ton désir »*

Paulo Coelho- L'Alchimiste

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures	4
Liste des tableaux	5
Liste des abbréviations	6
Résumé	9
Abstract	10
INTRODUCTION	11
La protection immunitaire	12
1.0 Le lymphocyte T	13
1.1 Structure du récepteur des lymphocytes T.....	13
1.2 Complexe récepteur des lymphocytes T : TCR-CD3.....	13
1.3 Corécepteurs du TCR : CD4 /CD8 et autres molécules accessoires.....	14
1.4 Rôles et fonctions des sous-populations des lymphocytes T CD4 et CD8.....	16
1.4.1 Les cellules Th1/Tc1.....	18
1.4.2 Les cellules Th2/Tc2.....	18
1.4.3 Les cellules Th17/Tc17.....	19
1.4.4 Les cellules T régulatrices.....	20
2.0 La signalisation au sein du système immunitaire	22
2.1 La voie de signalisation JAK-STAT.....	22
2.2 Vue d'ensemble du mécanisme d'activation de la voie JAK-STAT.....	22
2.3 La famille des molécules Janus Kinases (JAKs) de mammifères.....	23
2.4 La structure des molécules JAKs.....	26
2.5 La famille des molécules STATs et leur structure.....	27
2.6 Cytokines et STATs.....	30
2.7 Fonctions des STATs et pathologies correspondantes.....	31
3.0 La régulation négative de la voie JAK-STAT	35
3.1 La famille des PIAS.....	35
3.2 Les protéines tyrosine phosphatases (PTP).....	36
3.3 La famille des protéines SOCS.....	37
3.3.1 Aperçu général.....	37
3.3.2 Structure des protéines SOCS.....	37

3.3.3 Les fonctions physiologiques des protéines SOCS	42
3.3.4 Importance des SOCS-1 et SOCS-3 dans le système immunitaire	46
3.3.5 Effets neuroprotecteurs des SOCS-1 et SOCS-3	48
4.0 L'interféron Béta (IFN-β).....	51
4.1 Caractéristiques de la cytokine.....	51
4.2 Le récepteur de l'IFN-β et la voie de signalisation.....	52
4.3 Effets antiviraux de l'IFN-β	53
4.4 Rôles de l'IFN-β dans les réponses immunes	54
4.5 L'IFN-β comme thérapie immuno-modulatrice.....	55
4.5.1 Propriétés cliniques de l'IFN-β.....	55
4.5.2 Mécanismes d'action de l'IFN-β	57
5.0 L'interleukine-27 (IL-27).....	59
5.1 Caractéristiques de la cytokine.....	59
5.2 Le récepteur de l'IL-27 et la voie de signalisation.....	59
5.3 Rôles de l'IL-27 dans les réponses immunes	60
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	64
MATÉRIEL ET MÉTHODES	66
1.0 Isolement des cellules sanguines humaines.....	67
1.1 Isolement des cellules mononucléaires périphériques	67
1.2 Séparation des lymphocytes T CD8, CD4 et des monocytes (CD14).....	68
2.0 Essai fonctionnel sur les lymphocytes T et monocytes.....	71
2.1 Stimulation des lymphocytes T (CD8 et CD4)	71
2.2 Génération <i>in vitro</i> de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains.....	72
2.3 Vérification de la pureté cellulaire (T CD8, CD4 et monocytes)	73
3.0 Evaluation de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 par PCR en temps réel.....	75
3.1 Extraction de l'ARN total	75
3.2 Génération de l'ADN complémentaire (ADNc)	76
3.3 PCR en temps réel (' <i>Real time- Polymerase Chain Reaction</i> ')	76
4.0 Evaluation de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau protéique par immunocytochimie	79
RÉSULTATS.....	83
1.0 Effets de l'IFN-β sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3.....	84

1.1 L'IFN- β induit rapidement l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T humains.....	84
1.1.1 Cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau de l'ARNm par les lymphocytes T CD8 et CD4.....	84
1.1.2 Dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 et CD4.	92
L'exposition chronique à l'IFN- β induit uniquement le SOCS-1 de façon répétée	96
2.0 Effets de l'IL-27 sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3	101
2.1 L'IL-27 induit rapidement l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T humains.	101
2.1.1 Cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à l'IL-27 dans les lymphocytes T CD8 et CD4.....	101
2.2 IL-27 induit les SOCS-1 et SOCS-3 préférentiellement dans les cellules T CD8.	103
2.2.1 Dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 et CD4.	103
2.3 Comparaison de l'effet de l'IL-27 sur l'expression des SOCS par les cellules T.....	106
2.4 Comparaison des effets de l'IFN- β et de l'IL-27 sur les lymphocytes T.....	110
3.0 IFN-β et IL-27 induisent SOCS-1 et SOCS-3 au niveau protéique dans les lymphocytes T humains	112
DISCUSSION	120
1.0 L'IFN-β et l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T humaines....	123
1.1 Exposition aiguë à l'IFN- β	123
1.1.1 L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 varie selon le sous-type lymphocytaire	123
1.1.2 Efficacité équivalente de l'IFN- β sur les SOCS-1 et SOCS-3.....	126
1.1.3 Induction de SOCS-1 et SOCS-3 aux doses thérapeutiques d'IFN- β	127
1.2 L'exposition chronique à l'IFN- β induit différemment les SOCS-1 et SOCS-3	129
2.0 L'IL-27 et l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T humains	133
2.1 L'induction des SOCS-1 et SOCS-3 sélectivement dans les cellules T CD8.	133
2.2 Les SOCS-1 et SOCS-3 également influencés par l'IL-27.....	137
3.0 L'efficacité équivalente de l'IFN-β et l'IL-27 dans les cellules T CD8.....	139
4.0 Expression protéique des SOCS-1 et SOCS-3	141
CONCLUSION/ FUTURES PERSPECTIVES.....	143
BIBLIOGRAPHIE.....	147
ANNEXE.....	171

Liste des figures

Figure 1: La voie JAK-STAT.....	23
Figure 2: L'organisation structurale des molécules Janus Kinases.....	27
Figure 3: Structure schématique d'une molécule STAT.....	28
Figure 4: Structure schématique des huit membres de la famille SOCS :.....	38
Figure 5: Représentation schématique de l'enzyme E3 ligase.....	42
Figure 6: Cinétique des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 stimulés avec l'IFN- β	85
Figure 7: Cinétique des SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à l'IFN- β dans les cellules T CD4	88
Figure 8: Evaluation de l'effet de l'IFN- β sur l'expression mutuelle des SOCS-1 et SOCS-3	89
Figure 9: Représentation de l'augmentation de SOCS-1 et SOCS-3 sous forme de puissance sous l'effet de l'IFN- β	90
Figure 10: Courbe dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau des cellules T CD8 stimulées avec l'IFN- β	94
Figure 11: Courbe dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau des cellules T CD4 stimulées avec l'IFN- β	95
Figure 12: Réponses des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 suite à une exposition répétée à l'IFN- β	97
Figure 13 : Réponses des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD4 suite à une exposition répétée à l'IFN- β	100
Figure 14: Cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 et CD4 en réponse à l'IL-27.....	102
Figure 15 : Dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 et CD4 en réponse à l'IL-27.....	104
Figure 16: Effet de l'IL-27 sur l'expression mutuelle des SOCS-1 et SOCS-3.....	108
Figure 17: Représentation de l'augmentation de SOCS-1 et SOCS-3 sous forme de puissance sous l'effet de l'IL-27.....	109
Figure 18: Visualisation de l'expression protéique de SOCS-1.....	115
Figure 19 : Détection de l'expression de SOCS-3 au niveau protéique.....	116
Figure 20: Expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau protéique.....	119

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des différents sous-types de lymphocytes T.....	21
Tableau 2: Phénotype des souris déficientes pour des molécules STATs	33
Tableau 3: Les voies de signalisations JAK/STAT empruntées par les cytokines de la classe I et II.....	34
Tableau 4: Tableau récapitulatif des principaux rôles des SOCS.....	45
Tableau 5: Fluorochromes utilisés en cytométrie de flux.....	74
Tableau 6: Anticorps utilisés en cytométrie de flux.....	74
Tableau 7: Anticorps utilisés en immunocytochimie.....	82
Tableau 8: Effets de chacune des cytokines IFN- β et IL-27 sur les cellules T.....	111
Tableau 9: Expression protéique de SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 en réponse à l'IFN- β	117
Tableau 10: Tableau de comparaison des cellules T CD8 exprimant SOCS-1/SOCS-3 en réponse avec l'IL-27	117
Tableau 11: Tableau comparatif des cellules T CD4 exprimant SOCS-1/SOCS-3 en réponse avec l'IFN- β	118
Tableau 12: Tableau de comparaison des cellules T CD4 exprimant SOCS-1/SOCS-3 en réponse à l'IL-27.....	118

Liste des abréviations

A488	Alexa Fluor [®] 488 (fluorochrome)
ADN	Acide déoxyribonucléique
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASB	Ankyrin-repeat-containing proteins
ATP	Adénosine tri-phosphate
BCR	B cell receptor
BHE	Barrière hématoencéphalique
C-ESS	C-extended SH2 domain
Ca ²⁺	Ion calcium
CBP	CREB-binding protein
CD	Cellules dendritiques
CD	Cluster of differentiation
CDp	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CT-1	Cardiotrophin 1
CTL	Cytotoxic T lymphocytes (CD8 ⁺)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
EAU	Experimental autoimmune uveitis
EGF-R	Epidermal growth factor receptor
EPO	Erythropoietin
FADD	Fas associating protein with death domain
FITC	Fluorescein (fluorochrome)
FoxP3	Forkhead box P3
GAS	Gamma activation site
GATA-3	"GATA" DNA sequence recognizing transcription factor 3
GH	Growth hormone
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
gp130	Glycoprotein 130
GTP	Guanosine triphosphate
HAT	Histone acetyl transferase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α receptor
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IM	Intra-musculaire
iNOS	Inductible nitric oxide synthase
IRAK-4	IL-1R associated kinase- 4
IRF-9	IFN-regulatory factor 9
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRSE	IFN-stimulated response element

ISG	IFN stimulated genes
ISGF3	IFN stimulated genes factor 3
IL	Interleukin
IL-27R	IL-27 receptor
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KIR	Kinase inhibitory region
LFA-1/ -2	Lymphocyte function associated-1/-2
LIF	Lymphocyte inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharide
MAL	MyD88-adaptor-like protein
MAD5	Melanoma differentiation-associated gene 5
MCM 3,5	Minichromosome maintenance 3, 5
MMP	Matrix metalloproteinase
MS	Multiple sclerosis
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
Mx A/B	Myxovirus resistance protein A/B
N-ESS	N- terminus extended SH2 subdomain
NES	Nuclear export signals
NF-kB	Nuclear factor kB
NK	Natural killer cells
NLS	Nuclear localization signals
OAS	2'-5' Oligoadenylate synthetase
Opn-I	Osteopontin-I
OSM	Oncostatin M
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PB	Pacific Blue™ (fluorochrome)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PE	Phycoerythrin (fluorochrome)
PEST	Proline-, glutamic-acid-, serine- and threonine-rich
PIAS	Protein inhibitor of activated STATs
PKR	RNA-dependent protein kinase
PRRs	Pattern recognition receptors
PTP	Protéines tyrosine phosphatases
PTP1B	Phospho-tyrosine phosphatase 1B
Rbx2	RING-box-2
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
ROR- γ t	Retinoid orphan receptor γ
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SC	Sous-cutané
SEP	Sclérose en plaques
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SSB	SPRY domain-containing proteins
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SUMO	Small ubiquitin like-modifier
T-bet	T-box expressed in T cells
Tc	Cytotoxic T cells (CD8 ⁺)
TCR	T cell receptor
TGF- β	Transforming growth factor- beta

Th	T helper cells (CD4 ⁺)
Tkip	Tyrosine kinase inhibitor peptide
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
T _{reg}	Regulatory T cells
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
WSB	WD-40-repeat containing proteins

Résumé

Les cytokines jouent un rôle fondamental dans la régulation des processus biologiques via la cascade de signalisation JAK-STAT. Les « *Suppressors of Cytokine Signalling* » (SOCS), protéines intracellulaires, inhibent la voie JAK-STAT. Plusieurs études supportent leur implication dans des maladies immunitaires, mais peu d'informations sont disponibles sur leur expression par les lymphocytes T humains. Nous postulons que les cytokines Interféron- β (IFN- β) et Interleukine-27 (IL-27), dotées d'un potentiel immuno-régulateur, ont des rôles bénéfiques via l'induction des SOCS.

L'impact de l'IFN- β et l'IL-27 sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 par des cellules T CD8 et CD4 humaines a été étudié en utilisant des cellules sanguines de donneurs sains. L'expression de ces régulateurs a été évaluée aux niveaux de l'ARNm par qRT-PCR et protéique par immunocytochimie. Les SOCS-1 et SOCS-3 ont été rapidement induits en ARNm dans les deux types cellulaires en réponse à l'IFN- β ou l'IL-27 et une augmentation de l'expression a été confirmée au niveau protéique. Afin de mimer les thérapies à base d'IFN- β , les cellules T ont été exposées chroniquement à l'IFN- β . Après chaque ajout de cytokine les cellules T ont augmenté l'expression du SOCS-1, sans moduler le SOCS-3. L'IL-27 a induit les SOCS-1 et SOCS-3 préférentiellement dans les cellules T CD8 ; ceci corrèle avec des résultats du laboratoire démontrant une plus petite expression des récepteurs à l'IL-27 par les lymphocytes T CD4 que les CD8.

Notre projet a permis d'élucider l'expression des SOCS dans deux populations de cellules T et de clarifier les mécanismes d'actions de l'IFN- β et l'IL-27.

Mots-clé: SOCS-1, SOCS-3, lymphocytes T CD8, lymphocytes T CD4, IFN- β , IL-27, Sclérose en plaques.

Abstract

Cytokines regulate fundamental biological processes via the JAK-STAT signaling pathway. Suppressors of Cytokine Signaling proteins (SOCS), intracellular proteins, inhibit the JAK-STAT pathway. Emerging evidence supports the involvement of SOCS in diseases of the immune system but no data is available regarding their expression in human T cells. We postulate that the cytokines Interferon- β (IFN- β) and Interleukin-27 (IL-27), both potential immuno-regulators, have beneficial roles through the induction of SOCS proteins.

The impact of IFN- β and IL-27 on the SOCS-1 and SOCS-3 expression by human CD4 and CD8 T cells was assessed using peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. We evaluated the expression of SOCS-1 and SOCS-3 at the mRNA level by qRT-PCR and at the protein level by immunocytochemistry. A rapid increase of SOCS-1 and SOCS-3 mRNA levels was observed upon cytokine addition, and such upregulation was confirmed at the protein level. To mimic patients under IFN- β treatment, both T cell subsets were chronically exposed to IFN- β . We observed an increase of SOCS-1 after each stimulation but not for SOCS-3. IL-27 stimulation increased SOCS-1 and SOCS-3 mRNA levels in CD8 T cells but only slightly in CD4 T cells; these observations correlate with previous observations in our laboratory showing less IL-27 receptors on CD4 T cells than CD8 counterparts.

Our project determined the distinct expression of SOCS proteins in different human T cells subsets. This study could highlight the mechanism of action of cytokines such as IFN- β and IL-27.

Keywords: SOCS-1, SOCS-3, CD8 T lymphocytes, CD4 T lymphocytes, IFN- β , IL-27, Multiple sclerosis.

INTRODUCTION

La protection immunitaire

Le système immunitaire est le système de défense par excellence de tout être vivant. L'immunité des vertébrés est constituée de deux composantes qui opèrent de façon coopérative et interdépendante afin de fournir une protection plus efficace. L'une des composantes est non spécifique ou innée alors que l'autre est adaptative. L'immunité innée apporte la première ligne de défense lors du moment critique qui se situe juste après l'exposition à un pathogène. Les principaux acteurs de cette composante ne sont pas spécifiques à un antigène particulier. Toutefois, ils sont doués pour reconnaître des motifs moléculaires appelés PAMP (*'Pathogen Associated Molecular Pattern'*) qui sont conservés au niveau de divers microorganismes. Ces motifs sont reconnus au moyen des récepteurs PRR (*'Pattern Recognition Receptors'*) dont les récepteurs *Toll-like* (Janeway and Medzhitov, 2002). Les éléments de la signature de l'immunité innée regroupent les barrières anatomiques (peau, muqueuses), les barrières physiologiques (température, médiateurs chimiques tels que lysosomes et complément), les barrières inflammatoires et finalement les barrières phagocytaires. Cette dernière catégorie comprend les cellules dotées d'une capacité de phagocytose et d'internalisation du matériel extracellulaire étranger. Ce sont principalement, les macrophages, les cellules B et les cellules dendritiques, appelés aussi cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Après internalisation et dégradation, ces cellules favorisent l'apprêtement et la présentation antigénique par des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En cas de nécessité, lorsque le pathogène semble combattre avec ardeur, l'immunité innée envoie des signaux de rescousse, telle que la sécrétion de cytokines, activant ainsi la composante adaptative adéquate pour intervenir. Cette dernière présente cinq attributs : la spécificité antigénique, la restriction au CMH, la diversité, la mémoire immunitaire et la distinction du Soi et du non Soi. L'immunité adaptative est divisée en deux branches : soit la branche humorale impliquant les lymphocytes B qui reconnaissent l'épitope antigénique par leur récepteurs BCR (*'B Cell Receptor'*). Ces cellules deviennent ainsi activées et sécrètent des anticorps neutralisants. La deuxième branche est à médiation cellulaire et comprend les lymphocytes T qui ne peuvent reconnaître un épitope que s'il est lié à une molécule du CMH à la surface d'une cellule du Soi et ce, grâce au récepteur TCR (*'T Cell Receptor'*). Une fois activés, les lymphocytes T acquièrent des fonctions leur permettant d'éliminer des pathogènes (Vivier and Malissen, 2005).

Une rupture de l'homéostasie du système immunitaire peut entraîner des conséquences majeures et graves telles que le développement de cancers ou des maladies auto-immunes citons entre autres la sclérose en plaques.

1.0 Le lymphocyte T

1.1 Structure du récepteur des lymphocytes T

Le récepteur à la surface des lymphocytes T (TCR) a la capacité de reconnaître sélectivement un antigène étranger, à condition qu'il soit exposé sous forme d'un complexe peptide-CMH à la surface d'une cellule du Soi, telles que les CPA. Le TCR appartient à la superfamille des immunoglobulines et est constitué d'un hétérodimère formé des chaînes pairées de type α et β ou γ et δ (Le Deist et al., 2007). Les cellules ayant un TCR de type $\alpha\beta$ sont les plus fréquentes au sein des lymphocytes T. Chaque chaîne du TCR est formée de deux domaines extracellulaires constants et variables contenant des liaisons disulfures intra-chaînes reliant les cystéines espacées. De plus, un pont disulfure est nécessaire pour assurer un lien entre les deux chaînes et ce afin de préserver l'intégrité du TCR. Les chaînes du TCR, en plus des domaines extracellulaires, ont une région transmembranaire hydrophobe formée de résidus d'acides aminés chargés positivement et une courte queue cytoplasmique. Au niveau de l'ADN, chacune des chaînes est encodée par des segments multigéniques de type V, D, J, C (le segment D est absent chez les chaînes α et γ) (Oltz, 2001). Donc, lors de la formation d'un TCR fonctionnel, le lymphocyte T aura des possibilités de combinaisons énormes, ce qui explique la grande diversité des TCR et subséquentement les capacités de reconnaissance antigéniques diversifiées (Mazza and Malissen, 2007).

1.2 Complexe récepteur des lymphocytes T : TCR-CD3

Le récepteur des lymphocytes T est intimement lié à une protéine membranaire appelée CD3 qui vient renforcer la reconnaissance peptide-CMH. Le CD3 est un complexe multimoléculaire formé de cinq chaînes polypeptidiques nommées : γ , δ , ϵ , ζ et η . Les queues cytoplasmiques des chaînes du CD3 portent des motifs moléculaires appelés ITAM

(*'Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif'*) (Davis, 2002). Ces molécules sont constituées de deux résidus de tyrosine séparés par une séquence de 6-8 acides aminés et flanqués par une série d'acides aminés semi-conservés. Les molécules ITAM entrent en interaction avec des tyrosines kinases et jouent un rôle important dans la transduction du signal dans les cellules T. En fait, lorsque le TCR est engagé par un peptide, les motifs ITAM sont phosphorylés par une kinase Lck ou Fyn (de la famille Src) et induisent ainsi le recrutement d'une autre kinase appelée ZAP-70 associée à la chaîne CD3 ζ (Salmond et al., 2009). Une fois que les motifs ITAM se lient à la molécule ZAP-70, l'activation de cette dernière conduit à la phosphorylation de deux protéines adaptatrices critiques : LAT (*'Linker for the Activation of T cells'*) et SLP-76 (*'Src homology 2 (SH2)-domain-containing Leukocyte Phosphoprotein'*). Ces deux protéines sont impliquées dans le recrutement de diverses molécules de signalisation. Elles participent donc, à l'initiation des cascades biochimiques servant à la production de cytokines, à la prolifération des lymphocytes T et à leur différenciation selon le cas (Lin and Weiss, 2001; Choudhuri and van der Merwe, 2007; Au-Yeung et al., 2009; Salmond et al., 2009).

1.3 Corécepteurs du TCR : CD4 /CD8 et autres molécules accessoires

Bien que la reconnaissance du complexe peptide-CMH ne soit accomplie que par le TCR-CD3, d'autres molécules s'avèrent indispensables pour renforcer cette liaison. Les corécepteurs CD4 et CD8 favorisent une interaction et une avidité TCR/CD3-peptide /CMH optimales (Garcia et al., 1999; Rudolph et al., 2006). Les CD4 et CD8 sont des composés intrinsèques du complexe TCR. Ainsi, en se basant sur le type du corécepteur exprimé à la surface cellulaire, la famille des lymphocytes T se divise en deux sous-populations : les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8. Notons que ces corécepteurs participent aussi à la transduction du signal (Malissen, 2003).

La molécule CD4 est une glycoprotéine monomérique formée de quatre domaines extracellulaires D1, D2, D3, D4 ayant une conformation en repliement de type immunoglobuline. La molécule CD8 quant à elle est formée d'un hétérodimère $\alpha\beta$ ou d'homodimère $\alpha\alpha$ stabilisé par des résidus de cystéine, l'hétérodimère est le plus fréquent. Ces chaînes ont toutes les deux une conformation de type immunoglobuline. Le CD8 et le CD4 ont une région transmembranaire hydrophobe et une longue prolongation

intracellulaire (longueur un peu moins prononcée pour le CD8) (Leahy, 1995). Les corécepteurs CD4 et CD8 (forme hétérodimère), par l'intermédiaire de leurs domaines extracellulaires, ont la particularité d'interagir aux régions proximales des molécules de CMH de classe II et de classe I respectivement se trouvant à la surface des CPA ou des cellules cibles. Le CD4 a une affinité particulière pour la molécule de CMH de classe II qui se retrouve à la surface des CPA. Cette molécule de CMH contient un domaine externe formé de deux chaînes : α (deux sous-unités $\alpha1$ et $\alpha2$) et β (deux sous-unités $\beta1$ et $\beta2$). Les deux chaînes sont ancrées à la membrane par une région transmembranaire et ont une queue cytoplasmique. La molécule CD4 se lie spécifiquement aux sites $\alpha2$ et $\beta2$ (Konig and Zhou, 2004) de la molécule de CMH de classe II. En revanche, le CD8 (hétérodimère) s'associe spécifiquement aux molécules CMH de classe I distribuées à la surface de la majorité des cellules nucléées. Bien que les molécules de CMH de classe II et I sont apparentées du point de vue forme et fonction, notons que le CMH de classe I présente certaines différences au niveau de la structure tridimensionnelle. En fait, il est constitué d'une seule chaîne α organisée en trois sous-unités $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$. Cette dernière sous-unité s'associe de manière non covalente à une molécule $\beta2$ -microglobuline (n'ayant pas de segment transmembranaire) (Gao and Jakobsen, 2000; Wang and Reinherz, 2002). Toutefois le CD8 se lie préférentiellement aux modules $\alpha2$, $\alpha3$ et $\beta2$ -microglobuline du CMH de classe I (Sun et al., 1995; Hansen and Strassburger, 2000). Après liaison des corécepteurs aux molécules de CMH, les CD4 et CD8 ont la capacité de s'associer à la kinase Lck et de s'impliquer alors dans la cascade de signalisation au sein des lymphocytes T (Veillette et al., 1988; Barber et al., 1989; Kappes, 2007).

En plus des corécepteurs, il existe des molécules accessoires qui viennent stabiliser et/ou qui interviennent dans la transduction du signal et donc participent à l'activation des lymphocytes T. Citons les molécules LFA-1 (*Lymphocyte Function Associated-1*), LFA-2, CD28, CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*) CD45R et CD5. Chacune de ces molécules a son propre ligand à la surface des CPA : ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), LFA-3, B7 (pour CD28 et CTLA-4), CD22 et CD72 respectivement (Leo et al., 1987). Parmi ces molécules, l'interaction entre le CD28 et les B7 induit un signal de co-stimulation permettant l'activation et la prolifération d'un clone spécifique de cellules T et ce en favorisant la production de l'IL-2 (Interleukine-2) (Fraser et al., 1991). Plusieurs groupes ont démontré aussi que les autres molécules accessoires citées ci-dessus ont des

rôles fonctionnels permettant d'avoir une activation des cellules T complète et ce *in vitro* et *in vivo*. Les études ont montré qu'une déficience de certaines molécules accessoires aboutit à des pathologies graves (Krensky et al., 1983; Young et al., 1992; Buckley, 2004; Chen, 2004; Waeckerle-Men et al., 2007; Vincenti, 2008).

1.4 Rôles et fonctions des sous-populations des lymphocytes T CD4 et CD8

Les lymphocytes T CD4 ou auxiliaires (Th) jouent un rôle pivot au sein de la réponse immunitaire en se comportant comme chef d'orchestre et ce, tout en contrôlant l'activation des autres cellules immunitaires. Les lymphocytes T CD4 naïfs deviennent activés lorsqu'ils reconnaissent un complexe peptide-CMH-II particulier à la surface des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA), cette interaction engendre un premier signal qui agit de concert, avec une co-stimulation adéquate, tel que décrit précédemment. Ceci conduit à l'activation et à l'expansion clonale des cellules Th. La qualité des réponses des lymphocytes T dépendent d'une multitude de facteurs fournis par les CPA professionnelles, puisque ces dernières ne sont pas toutes équivalentes et en conséquent induisent une variabilité au niveau des profils phénotypiques des cellules T. En fait, les CPA variées diffèrent par leurs mécanismes de capture de l'antigène, par le niveau de molécules de CHM-II, par leur activité de co-stimulation, par leur emplacement physiologiques. La population des lymphocytes T CD4 regroupe des médiateurs cellulaires qui jouent un rôle essentiel dans l'initiation et l'amplification des réponses immunitaires. En général, ces cellules n'ont pas de capacité cytotoxique directe, ni d'activité de phagocytose, et ne peuvent donc pas éliminer directement les cellules infectées. Par contre, elles peuvent activer des cascades cellulaires déclenchant l'apoptose et la mort des cellules infectées. Les lymphocytes T CD4 régulent les réponses immunitaires, en interagissant avec d'autres acteurs cellulaires, tels les lymphocytes T CD8, pour qu'ils effectuent leurs fonctions. Les lymphocytes Th fournissent aussi une fonction d'aide et d'activation à la branche humorale (cellules B) via la liaison CD40-CD40L .

Les lymphocytes T CD8, appelés cellules T cytotoxiques (Tc), ont la particularité de reconnaître un peptide associé à une molécule CMH classique de classe I à la surface des cellules du Soi. Une fois activées, les Tc se différencient en cellules effectrices et prolifèrent. Elles se comportent comme des cellules d'attaque qui détruisent directement

des cellules du Soi altérées exposant des antigènes cibles et ce, par l'intermédiaire de mécanismes cytolytiques. Un des mécanismes les plus performants est effectué par des enzymes lytiques qui sont libérées par exocytose après l'activation des cellules Tc : en présence de Ca^{2+} , les molécules de perforine s'insèrent dans la membrane des cellules cibles pour former des pores, ce qui facilite l'entrée des granzymes. Particulièrement, les granzymes de type B ont la fonction pro-apoptotique la plus notable et ce, en activant une voie de signalisation caspase-dépendante. Alors que les granzymes A et K induisent la mort cellulaire par des mécanismes caspase-indépendants en clivant des régions spécifiques de l'ADN. Il y a aussi les granzymes C, H, M dont la fonction est encore controversée (Voskoboinik et al., 2006; Bolitho et al., 2007). L'élimination des cellules potentiellement dangereuses par les lymphocytes T peut aussi être médiée par des récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée, ce sont les récepteurs de mort. Citons le prototype Fas à la surface des cellules infectées qui se lie à son ligand Fas-L au niveau des cellules T, ce qui initie le recrutement de diverses molécules (FADD (*Fas Associating protein with Death Domain*)) et caspase-8), ceci aboutit à l'apoptose. Seuls les lymphocytes T CD4 et CD8 ayant un phénotype activé peuvent accomplir leur mission. En fait, l'activation des cellules T nécessitent trois signaux : la reconnaissance antigénique, le signal de co-stimulation et la réponse aux cytokines. Ces signaux sont primordiaux et aboutissent à l'acquisition des fonctions effectrices variées, engendrant ainsi d'une part des cellules effectrices et d'autre part des cellules mémoires.

Les cytokines produites par les cellules de la réponse innée et la nature des peptides présentés par les CMH participent énormément à la polarisation des cellules T vers un phénotype de cellule effectrice. Cette polarisation est initiée en induisant l'expression des gènes spécifiques responsables de l'activation, la différenciation et la prolifération des cellules T. En se basant sur le profil des cytokines induites, les cellules T CD4 (Th) et T CD8 (Tc) effectrices sont différenciées en plusieurs sous-populations dont trois sous-types sont les mieux caractérisés dans la littérature. Les sous-types provenant des lymphocytes T CD4 ou CD8 ont des fonctions et des profils cytokiniques très similaires ; citons les Th1/Tc1, Th2/Tc2 et Th17/Tc17. Toutefois moins d'informations sont disponibles concernant la polarisation des sous-types des cellules Tc (Croft et al., 1994; Mosmann et al., 1997; Cerwenka et al., 1998; Cerwenka et al., 1999; Woodland and Dutton, 2003).

1.4.1 Les cellules Th1/Tc1

Les Th1/Tc1 sécrètent principalement de l'IL-2 (Interleukine-2), de l'IFN- γ (Interféron-gamma) et du TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Cette sous-population confère à l'organisme une protection contre une variété d'infections microbiennes et de pathogènes intracellulaires. De plus, elle oriente les réponses immunitaires vers la branche à médiation cellulaire telle que l'activation des mécanismes cytotoxiques. En présence d'IL-12 (ou l'IFN- γ) et du STAT4 activé (ou STAT1) (*Signal Transducer and Activator of Transcription-1, -4*), l'expression du facteur de transcription T-bet (*T-box expressed in T cells*) sera induite ainsi, la polarisation vers Th1/Tc1 est favorisée (Thierfelder et al., 1996; Afkarian et al., 2002; Szabo et al., 2002). Cette sous-population a été accusée d'être le principal médiateur des maladies auto-immunes à cause des quantités élevées d'IFN- γ et de TNF produites (Hoyer et al., 2009).

1.4.2 Les cellules Th2/Tc2

La deuxième sous-population est nommée Th2/Tc2, elle intervient dans l'activation de la réponse à médiation humorale (cellules B) et dans l'élimination des pathogènes extracellulaires, tout en sécrétant des cytokines tels que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13. De plus, cette population participe à la suppression de l'activité pro-inflammatoire des cytokines sécrétées par les cellules de type Th1/Tc1. La présence d'IL-4 et l'induction des facteurs GATA-3 (*GATA DNA sequence recognizing transcription factor 3*) et STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-6*) sont nécessaires au développement de la lignée Th2 (Scheinman and Avni, 2009). Bien que les cellules Th2/Tc2 aient une utilité anti-inflammatoire, une activation incontrôlée conduit au développement de réactions allergiques et a un rôle dans la pathologie de l'asthme (Betts and Kemeny, 2009).

1.4.3 Les cellules Th17/Tc17

Les Th17/Tc17 constituent la troisième sous-population et sécrètent principalement l'IL-17A, l'IL-17F, le TNF, l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-22. Cette sous-population a un effet remarquable au niveau de l'inflammation, de plus elle offre une protection contre des pathogènes extracellulaires. En fait, tout comme la sous-population Th1/Tc1, ces cytokines produites ont été mises en cause dans le déclenchement et l'aggravation de plusieurs maladies auto-immunes, ce qui a été démontré chez des modèles animaux de sclérose en plaques, d'arthrite rhumatoïde, de colites, et d'uvéïte humaine (Hoyer et al., 2009; Tang et al., 2009). La polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs en Th17 est provoquée par des conditions différentes chez l'humain et chez la souris (McGeachy and Cua, 2008). Les lymphocytes T CD4 murins sont activés en présence du TGF- β et de l'IL-6, ces cytokines induisent de concert l'expression du facteur de transcription ROR γ t (*Retinoid-related Orphan Receptor-gamma*) essentiel au développement des cellules Th17 dans les modèles murins (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Les cytokines impliquées dans le développement des Th17 chez l'humain demeurent moins élucidées où plusieurs études contradictoires ont été publiées. Un groupe de chercheurs avait démontré que le déclenchement de la polarisation vers des Th17 résulte de la stimulation des cellules T CD4 par les cytokines TGF- β et IL-21 (Yang et al., 2008). En revanche, d'autres groupes ont observé que l'action en synergie de l'IL-23 et de l'IL-1 s'avère nécessaire pour l'induction des Th17 humains. De plus, l'IL-23 et/ou l'IL-6 peuvent être impliqués dans l'amplification du processus (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Wilson et al., 2007; McGeachy and Cua, 2008). Il a été observé dans plusieurs lésions inflammatoires une co-localisation des cellules Th1 et Th17, ce qui suggère qu'elles peuvent contribuer via des fonctions redondantes ou complémentaires dans le développement de certaines pathologies. La présence d'un chevauchement au niveau des activités induites par ces deux sous-types cellulaires a été démontré ; des Th17 peuvent sécréter de l'IFN- γ et des Th1 ont la capacité de produire de l'IL-22 (Spolski and Leonard, 2009). Toutefois, moins d'informations sont disponibles concernant la sous-population Tc17 récemment identifiée comparativement aux cellules Tc1 et Tc2. Or, il a été démontré que les Tc17 sont responsables d'une protection unique dans les poumons de souris infectées d'un virus de type Influenza A, en induisant une augmentation précoce d'un influx de neutrophiles (Hamada et al., 2009; Kondo et al., 2009).

1.4.4 Les cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices (Tregs) sont un tout autre sous-type de lymphocytes T; elles expriment le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead box P3*) et sont responsables des fonctions d'auto-tolérance et de résistance aux maladies auto-immunes (Andre et al., 2009). Des humains et des souris présentant des gènes *foxp3* inactifs développent des pathologies inflammatoires sévères au niveau de multiples organes, avec la fabrication d'auto-anticorps (Wildin et al., 2001; Fontenot et al., 2003; Gambineri et al., 2003; Hori et al., 2003). Les Tregs ont offert une protection contre des maladies auto-immunes telles que l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE- modèle pour la sclérose en plaques), la colite et le lupus érythémateux (McGeachy et al., 2005; Alvarado-Sanchez et al., 2006; de Zoeten and Hancock, 2008). Selon le consensus général, on distingue des cellules Tregs « naturelles » qui se développent dans le thymus, et des cellules régulatrices « induites » qui se différencient généralement en périphérie à partir de cellules T conventionnelles après la rencontre avec l'antigène. Ainsi les cellules iTregs génèrent deux sous-types cellulaires; Tr1 et Th3. Les cellules Tregs sécrètent des cytokines inhibitrices de type IL-10, TGF- β et IL-35 jouant un rôle critique dans les mécanismes de suppression (Workman et al., 2009). Très récemment, le groupe Ayyoub et collaborateurs a dévoilé un côté pro-inflammatoire des Tregs humaines (mémoires) en démontrant leur capacité à sécréter de l'IL-17 et à exprimer constitutivement le facteur de transcription ROR γ t. (Ayyoub et al., 2009). De plus, traditionnellement seuls des lymphocytes T CD4 étaient considérés comme générateurs de Tregs toutefois, très récemment, des cellules T CD8+ FoxP3+ ont été découvertes mais elles sont toujours moins caractérisées que les CD4+ FoxP3+ (Bisikirska et al., 2005; Lu and Cantor, 2008).

Tableau 1: Caractéristiques des différents sous-types de lymphocytes T

Sous-type cellulaire	Profil cytokinique	Rôle dans l'immunité	Récepteurs de chimiokines*
Th1/Tc1	IL-2, IFN- γ , TNF	Contribution à l'activation de la branche à médiation cellulaire, protection contre des pathogènes intracellulaires	CXCR3
Th2/Tc2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13	Stimulation de la branche humorale (cellules B), protection contre des pathogènes extracellulaires	CCR4/CRTh2
Th17/Tc17	IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22, TNF	Implication dans des maladies auto-immunes, offre une protection contre les pathogènes extracellulaires	CCR6/CCR4
Tregs	IL-10, TGF- β , IL-35	Auto-surveillance et protection contre les maladies auto-immunes	CCR6/CCR7

* Les récepteurs de chimiokines exprimés à la surface des sous-types de cellules T ont été tirés de (Sallusto and Lanzavecchia, 2009)

2.0 La signalisation au sein du système immunitaire

2.1 La voie de signalisation JAK-STAT

La cellule communique avec son environnement au moyen d'un réseau très complexe de messagers chimiques dont les cytokines. Plus particulièrement, la régulation de l'homéostasie des lymphocytes T est critique afin de maintenir les fonctions immunitaires normales. La réponse aux cytokines est l'un des trois signaux nécessaires pour communiquer avec les cellules T. Suite à leur liaison aux récepteurs correspondants, ces médiateurs génèrent les réponses biologiques adéquates afin de réguler la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Le message est transporté au noyau en activant diverses cascades de signalisation citons la voie JAK-STAT (*Janus Kinase and Signal Transducer and Activator of the Transcription*). Cette dernière a été identifiée comme étant une des voies universelles et essentielles à la signalisation cellulaire, de plus, elle est l'une des voies biologiques les mieux caractérisées et les plus étudiées (Larsen and Ropke, 2002; Murray, 2007). Dans les lymphocytes T, la voie JAK-STAT est responsable d'une coordination unique des signaux d'activation et d'inhibition (Ross et al., 2007).

2.2 Vue d'ensemble du mécanisme d'activation de la voie JAK-STAT

L'interaction d'une cytokine avec son récepteur à la surface cellulaire induit la dimérisation des domaines cytoplasmiques du récepteur, ainsi qu'une activation subséquente des molécules JAKs tyrosines kinases, associées de manière constitutive au récepteur (Takeda and Akira, 2000). Les molécules JAKs activées sont responsables de la phosphorylation de résidus de tyrosine sur les régions intracellulaires du récepteur qui serviront de sites d'amarrage et de liaison aux molécules STATs. Lorsque recrutées, les STATs sont rapidement phosphorylées par les molécules JAKs et forment par la suite des homo ou hétéro-dimères. Ces complexes quittent le récepteur et migrent vers le noyau, où ils s'associent à des séquences spécifiques de l'ADN et induisent leur transcription (Briscoe et al., 1996; Schindler, 1999; Haan et al., 2006) (voir Figure 1).

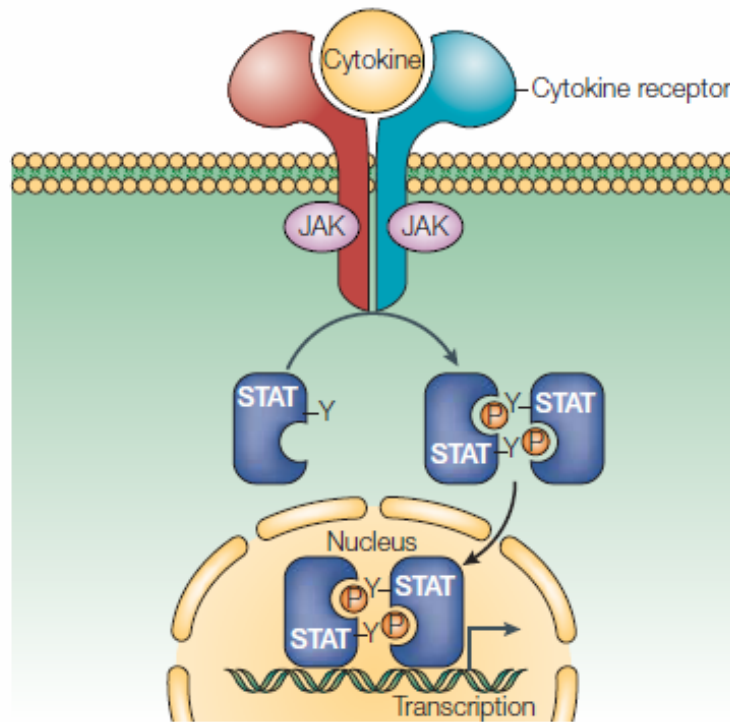


Figure 1: La voie JAK-STAT. Représentation schématique de la cascade de signalisation JAK-STAT. La liaison de la cytokine à son récepteur induit l'activation des molécules JAKs. Ce qui entraîne la phosphorylation des STATs et leur migration au noyau dans le but d'activer la transcription des gènes. Tirée de (Shuai and Liu, 2003).

2.3 La famille des molécules Janus Kinases (JAKs) de mammifères

Les molécules JAKs représentent un des dix sous-groupes de protéines cytoplasmiques dotées d'une activité de type tyrosines kinases (PTK). Elles sont de larges protéines constituées de 1 100 acides aminés et ont une poids moléculaire entre 120 et 140 kDa, ces caractéristiques ont compliqué la purification des molécules et donc, leur structure tridimensionnelle demeure méconnue. La famille des molécules JAKs regroupe quatre membres soit : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (Tyrosine Kinase 2). JAK1, JAK2 et TYK2 sont exprimés ubiquitairement, par contre, l'expression de JAK3 est principalement dominante dans les cellules du système hématopoïétique (Kawamura et al., 1994). Le nombre de molécules JAKs disponibles est restreint par rapport à la grande quantité de récepteurs, ainsi une seule ou une combinaison de molécules JAKs peuvent être

responsables de la transduction de divers signaux voire des effets opposés (survie vs. apoptose) (Larsen and Ropke, 2002; Murray, 2007). Les molécules JAKs sont essentielles pour la transduction des signaux provenant des récepteurs de cytokines de type I et II puisque ces récepteurs n'ont pas d'activité kinase intrinsèque. Les récepteurs de classe I sont formés de deux paires de cystéines conservées reliées par un pont disulfure et leur région C-terminale contient un motif WSXWS. Ces récepteurs sont divisés en quatre sous-familles selon les chaînes qui les constituent citons : les chaînes communes γ_c , β_c , gp130 et homodimériques (homologues aux hormones). Les récepteurs de classe II ont aussi deux paires de cystéines mais le motif WSXWS semble être manquant (O'Sullivan et al., 2007). La classe II des récepteurs se lie aux IFNs (interférons), à l'IL-10 et à l'IL-20 (Leonard and O'Shea, 1998).

JAK1 peut s'associer sélectivement à la chaîne γ_c commune des récepteurs de plusieurs cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21), cette molécule se lie aussi aux récepteurs portant la chaîne de la sous-unité commune gp130 (IL-6, IL-11, IL-27) (Ross et al., 2007; Ghoreschi et al., 2009). De plus, JAK1 reconnaît les récepteurs des cytokines de la famille des interférons (type I et II). JAK2 a la capacité d'intervenir avec les récepteurs de cytokines homologues aux hormones (*'hormones-like'*) (prolactine, thrombopoïétine, érythropoïétine, hormone de croissance), ainsi que les récepteurs des cytokines responsables du développement des cellules hématopoïétiques (IL-13 et GM-CSF (*'Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor'*)) (Argetsinger et al., 1993; Parganas et al., 1998). JAK2 est aussi reconnu pour son association aux récepteurs ayant les chaînes communes β_c (IL-3, IL-5), gp130 (IL-6, IL-27) et celles qui se lient à l'IFN- γ . Quant à JAK3, cette molécule est responsable de la transduction du signal des cytokines qui se lient aux récepteurs ayant une chaîne commune γ_c , comme les JAK1. TYK2 est nécessaire pour la transduction du signal du récepteur de l'IL-12 et du LPS (Lipopolysaccharide). En fait, les informations concernant le rôle de TYK2 dans la médiation du LPS demeurent faiblement élucidées. Il n'est pas encore connu s'il s'agit d'un effet direct ou indirect ou si TYK2 interagit avec les TLR (*'Toll-like Receptors'*). De plus, TYK2 peut s'associer à JAK1 et JAK2 mais pas avec JAK3. Par exemple, dans le cas du récepteur des cytokines IFN de type I (IFN- α/β), une combinaison de TYK2 et JAK1 est observée (Imada and Leonard, 2000; Yamaoka et al., 2004).

Il existe des modèles animaux déficients pour chacune des molécules JAKs, ce qui a permis d'étudier individuellement leurs caractéristiques et leurs fonctions.

Les souris déficientes en JAK1 développent très tôt des problèmes neurologiques et meurent de manière périnatale (Kovanen and Leonard, 2004). Des déficiences en JAK1 n'ont pas encore été identifiées et ciblées chez les humains, probablement pour cause de létalité.

Les souris *knock-out* pour le gène codant la molécule JAK2 ne sont pas viables à cause de complications survenant au niveau de l'érythroïèse durant le développement fœtal. Toutefois la déficience en JAK2 ne semble pas avoir de conséquences sur la progéniture lymphoïde (Neubauer et al., 1998; Ingley and Klinken, 2006).

Les souris déficientes pour le gène codant pour JAK3 développent la maladie de SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*). Cette pathologie est une des plus sévères forme d'immunodéficience qui se caractérise par une altération des fonctions chez les lymphocytes T et les cellules NK (Notarangelo et al., 2000), toutefois, les souris sont viables (O'Shea et al., 2004; Pesu et al., 2005). Une fonction déficitaire de JAK3 a été détectée chez l'humain qui se traduit, comme chez la souris, par le développement de l'immunodéficience grave (SCID). Ceci est dû à une altération de la transmission des signaux de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21 (Russell et al., 1995). En fait, comme discuté précédemment JAK3 est responsable de transmettre le message de cytokines qui se lient aux récepteurs ayant la chaîne commune γ_c . Notons que ces signaux sont cruciaux pour le recrutement, l'homéostasie et l'expansion clonale de cellules T (Li et al., 2001; Kovanen and Leonard, 2004).

Les souris *TYK2*^{-/-}, contrairement aux autres déficientes pour une des JAKs, peuvent avoir un développement normal. Toutefois ces souris semblent avoir une diminution de l'efficacité de la signalisation induite par les IFNs et l'IL-12. Ce qui explique leur vulnérabilité aux infections parasitaires et virales. Certaines études ont démontré que ces souris déficientes en TYK2 (souche B.10 Q/J) développent spontanément une susceptibilité aux infections par *Toxoplasma gondii* ou à *Leishmania major*. De plus, le même groupe a démontré que le TYK2 contrôle la production et la réactivation de l'IL-10 (Shimoda et al., 2000; Schleicher et al., 2004; Shaw et al., 2006). Récemment, une mutation homozygote de TYK2 a été identifiée chez l'humain. Les patients déficients en TYK2 souffrent d'un

syndrome d'hyper IgE (taux d'IgE élevé dans le sérum), incluant des dermatites, des infections bactériennes et virales sévères. Ces complications sont en grande partie dues à une altération de la signalisation des cytokines IL-6, IL-10 et l'IL-12 (Minegishi and Karasuyama, 2007) (voir tableau 2 p.33)

2.4 La structure des molécules JAKs

Chacune des molécules JAK est organisée en sept régions distinctes d'homologie JAK appelées JH (*'JAK Homology'*). Ainsi, en allant de l'extrémité C-terminale jusqu'à l'extrémité N-terminale, on distingue les régions dans l'ordre suivant: JH1, JH2, JH3, JH4, JH5, JH6 et JH7 (O'Shea et al., 1997; Leonard and O'Shea, 1998). La région JH1 contient un domaine kinase classique retrouvé chez la plupart des cellules eucaryotes et qui contient deux résidus de tyrosine qui seront phosphorylés après l'interaction cytokine-récepteur. En revanche, JH2 est constitué d'un domaine ayant une activité enzymatique et catalytique nulle, appelé aussi pseudo-kinase, mais JH2 semble avoir des fonctions de régulations jugées importantes (Shuai and Liu, 2003). En fait, une seule mutation (substitution d'une phénylalanine par une valine) au niveau du domaine de pseudo-kinase de la molécule JAK2 a été identifiée et repérée dans plusieurs pathologies humaines telles que la polycythémie vraie, la thrombocythémie essentielle et la myélofibrose idiopathique (Martinez-Aviles et al., 2007; Scott et al., 2007). De façon intéressante, les deux domaines JH1 et JH2 ayant des activités différentes sont juxtaposés de manière adjacente et en tandem, ce qui donne une structure unique et caractéristique aux molécules JAKs. L'extrémité amino-terminale des JAKs regroupe les domaines JH3 à JH7 et est subdivisée en deux parties; on distingue le domaine Src kinase SH2 incluant JH3 et JH4 et en second lieu, un domaine d'homologie FERM (*'Four-point-one (4,1), Ezrin, Radixin and Moesin'*) ont été mis en évidence. Ce dernier est formé d'un fragment F3 contenant les domaines JH4 et JH5, le fragment F2 inclut le domaine JH6 et finalement F1 qui contient JH7 (voir Figure 2). Le domaine FERM semble favoriser l'interaction constitutive des molécules JAKs avec la région cytoplasmique proximale du récepteur et régule l'activité kinase (Pearson et al., 2000; Haan et al., 2006).

En fait, les régions intracytoplasmiques des différents récepteurs n'ont que quelques séquences homologues et communes dont les deux motifs conservés appelés « boîte 1 » et

« boîte 2 ». La première est constituée de huit acides aminés et est très riche en résidus de proline; la deuxième boîte est caractérisée par un groupe de résidus d'acides aminés hydrophobes suivi par des acides aminés chargés positivement (Heinrich et al., 1998). Les « boîte 1 » et « boîte 2 » des récepteurs et la région N-terminale des molécules JAKs participent de concert au bon positionnement des JAKs, ce qui aboutira à une signalisation adéquate. La liaison d'une cytokine induit un changement de conformation du récepteur et alors une trans-phosphorylation des deux tyrosines conservées dans le domaine JH1 de JAK est initiée. Ceci aboutit à la formation des sites de liaisons des molécules STATs au récepteur, qui entreront ensuite dans le noyau, comme discuté précédemment.

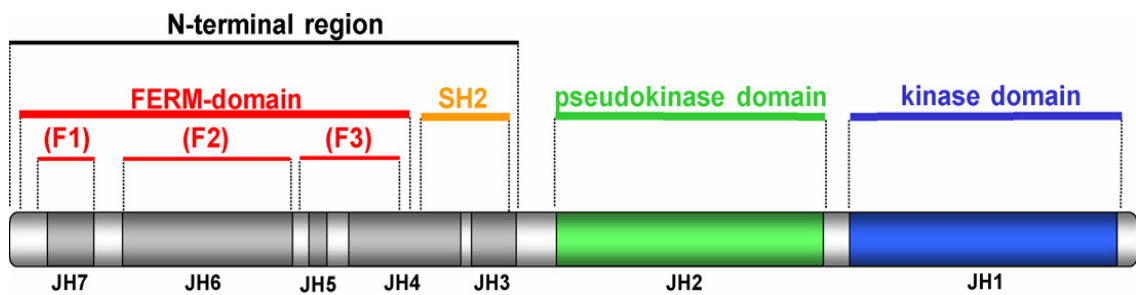


Figure 2: L'organisation structurale des molécules Janus Kinases. Les protéines cytoplasmiques JAKs possèdent un domaine kinase formé par le fragment JH1, un domaine pseudo-kinase incluant JH2. La région N-terminale est formée de deux domaines: l'un est de type SH2 constitué de JH3 et JH4 et l'autre est un domaine FERM contenant les segments JH4-JH7. Tirée de (Haan et al., 2006).

2.5 La famille des molécules STATs et leur structure

Les STATs (*'Signal Transducer and Activator of Transcription'*) sont des facteurs de transcription cytoplasmiques sous un état latent. Lorsqu'elles sont activées, ces molécules ont la capacité d'acheminer un message de la surface membranaire jusqu'au noyau. Sept membres des STATs ont été identifiés chez les mammifères soit: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Contrairement aux autres STATs,

l'expression de STAT4 est restreinte au thymus, aux cellules myéloïdes et aux testicules (Akira, 1999). Dépendamment de leurs fonctions, les STATs sont divisés en deux sous-groupes; les STAT2, STAT4 et STAT6 sont impliqués dans le développement des cellules T et dans la voie de signalisation de l'IFN- γ . Les STAT1, STAT3, et STAT5 sont exprimés dans différents tissus et sont activés par plusieurs ligands, de plus, ils participent à l'embryogenèse et à la signalisation des IFNs (Calo et al., 2003). Les molécules STATs ont un poids moléculaire variant entre 90 et 115 kDa (748 à 851 acides aminés de long). Ces facteurs de transcription ont six domaines distincts de par leur fonction: le domaine de transactivation à l'extrémité C-terminal, le domaine SH2 étant le plus conservé, la séquence de liaison ('*linker domain*'), le domaine qui interagit avec l'ADN, le domaine « *coiled-coil* » et la région N-terminal (voir Figure 3) (Darnell, 1997; Brierley and Fish, 2005). Les facteurs de transcription STATs sont uniques à cause de leur domaine SH2. En fait la tyrosine-phosphorylation des molécules STATs est un processus très rapide qui se produit dans les cellules. *In vitro*, il a été démontré que les STATs sont phosphorylés dans les 15 minutes qui suivent la stimulation des PBMC et lymphocytes T humains (Montag and Lotze, 2006) (Schneider et al. non publié).

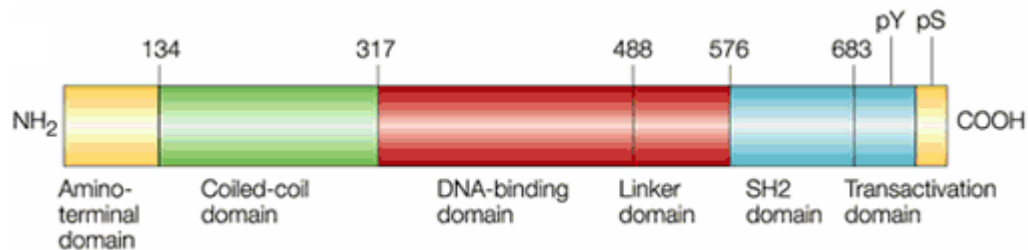


Figure 3: Structure schématique d'une molécule STAT. Ces facteurs de transcription sont formés de six domaines distincts : l'extrémité N-terminale, le domaine « *coiled-coil* », le domaine de liaison à l'ADN, la séquence de liaison, le domaine SH2 et le domaine de transactivation. Tirée de (Levy and Darnell, 2002).

Lorsque les molécules JAKs induisent la transphosphorylation de la partie cytoplasmique du récepteur, des sites de liaison aux molécules STATs sont créés. Ainsi ces molécules sont recrutées aux récepteurs via leur domaine SH2. Ceci permet aux

JAKs d'activer les molécules STATs en phosphorylant leur résidu tyrosine situé au domaine de transactivation (Horvath, 2000). En conséquence, les molécules STATs subissent un changement de conformation et se détachent du récepteur pour former des hétéro- ou homodimères par des interactions réciproques SH2-phosphotyrosine (Shuai et al., 1993; Chen and Khurana Hershey, 2007). Les dimères ont une forme spécifique entraînant leur liaison à des séquences consensus définies au niveau des gènes cibles (Huisin et al., 2006). La région N-terminale est impliquée dans la stabilisation des interactions entre deux molécules STATs. Ce domaine a une structure en forme d'hameçon (*hook-like*) qui est constitué de huit hélices- α . De plus, la région N-terminale est formée de résidus de tryptophane conservés au niveau de toutes les molécules STATs. Donc, de concert, les domaines N-terminaux des deux molécules STATs, forment des interactions hydrophiliques hélice- α -hélice- α , et les résidus de tryptophane sont engagés dans le processus de stabilisation des dimères (Horvath, 2000; Leonard, 2001). A cette étape, les deux molécules STAT phosphorylées vont alors se dissocier du récepteur et subséquemment entrer dans le noyau. Ces larges protéines doivent avoir des signaux de passage valides tels que les NLS (*Nuclear Localization Signals*) qui vont se lier à des importines α et $\beta 1$ pour transloquer via les pores nucléaires (Reich and Liu, 2006). En fait le domaine appelé « *coiled-coil domain* » semble être impliqué dans ces interactions protéine-protéine dépendamment de la molécule de STAT et des gènes cibles. Toutefois, son rôle n'est pas encore bien élucidé (Espert et al., 2003; Chen et al., 2004b; Brierley and Fish, 2005). Une fois dans le noyau, les dimères STATs se lient à l'ADN, par l'intermédiaire de leur domaine spécifique et ce, au niveau des promoteurs des gènes cibles afin d'initier la transcription (tels que les éléments GAS (*Gamma Activation Site*)) (Li et al., 1998; Vinkemeier et al., 1998). Plusieurs événements participent directement à l'optimisation de la phase de transcription, en induisant des modifications chimiques post-traductionnelles des molécules STATs. Citons, la méthylation d'un résidu arginine à l'extrémité N-terminale (Mowen et al., 2001), l'acétylation des STATs lors de l'association du domaine de transactivation avec des protéines co-activatrices (telles que MCM5, MCM3 (*Minichromosome Maintenance 3, 5*), HATs (*Histone AcetylTransferase*) et p300/CBP (*CREB-Binding Protein*)) (McDonald and Reich, 1999; Shankaranarayanan et al., 2001; Levy and Darnell, 2002), la phosphorylation d'un résidu sérine dans le domaine de transactivation ou à l'extrémité C-terminale (pour

certaines STAT). Toutes ces modifications dans la conformation des STATs participent à induire une meilleure activation de la transcription. Lorsque les molécules STATs ont effectué leur mission, elles sont déphosphorylées puis retournées au cytoplasme pour le recyclage, ceci est réglé par le «*coiled coil domain*» avec la nécessité d'un signal d'export nucléaire (NES) (Haspel and Darnell, 1999; McBride et al., 2000).

2.6 Cytokines et STATs

Les molécules STATs, tout comme les JAKs, sont induites par toutes les cytokines de classe I et II (détails section 2.3). Le nombre limité de STATs fait en sorte qu'un même facteur de transcription peut participer à la signalisation de plusieurs types de cytokines. Bien qu'une même molécule STAT soit activée par divers signaux, il a été observé que les souris déficientes pour un type particulier ne présentent pas une défectuosité de signalisation à tous les niveaux. Ceci demeure moins clair quant aux voies de signalisation non affectées : sont-elles moins importantes ou utilisent-elles des protéines autres que les STATs? Il est nécessaire de mentionner que la plupart des études portant sur les rôles des STATs ont été réalisées en stimulant des lignées cellulaires immortalisées avec de hautes concentrations de cytokines.

Le STAT1 semble avoir une spécificité de reconnaissance en participant principalement à la voie de signalisation des IFNs de type I (IFN- α , IFN- β , IFN- ω) et II (IFN- γ). Par contre, le STAT2 est induit par un nombre de cytokines plus restreint soit uniquement les IFNs de classe I. Le STAT3 est activé particulièrement par des cytokines qui se lient aux récepteurs ayant la chaîne gp130 (IL-6, IL-11, IL-27, LIF...). Le STAT3 peut aussi contribuer à la signalisation de messages provenant des récepteurs ayant la chaîne commune γ c (IL-2, IL-7, IL-9, IL-15) et des cytokines se liant aux récepteurs homodimériques (hormone de croissance). De plus, le STAT3 peut contribuer à la voie de signalisation de l'IL-10 qui fait partie des cytokines de la classe II. Le STAT4 est induit par l'IL-12 (ayant un récepteur de la famille gp130). Les deux molécules de STAT5 se lient aux récepteurs d'hormones (prolactine, thrombopoïétine, érythropoïétine, hormone de croissance), aux récepteurs β c (IL-3, IL-5, GM-CSF) et à ceux qui ont la chaîne commune

γ c. Finalement STAT6 passe à l'état actif sous l'effet des cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-13 (famille γ c) (Leonard and O'Shea, 1998; Schindler, 2002).

2.7 Fonctions des STATs et pathologies correspondantes

Les fonctions physiologiques des molécules STATs, comme pour les JAKs, ont été élucidées en étudiant l'effet de leur absence dans des modèles de souris, puis prouvées ensuite chez l'humain.

Les souris qui n'expriment pas le STAT1 sont viables et ont un développement normal hors, les réponses biologiques impliquant la signalisation des IFN sont altérées. Ce qui explique leur susceptibilité extrême quant aux infections virales et leur immunité innée affaiblie (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Chez l'humain, il a été démontré qu'une déficience en STAT1 entraîne des pathologies d'ordre virales et mycobactériennes à cause d'une aberration au niveau de la signalisation des IFNs de type I et II (Dupuis et al., 2001; Dupuis et al., 2003). Une dérégulation de l'expression de STAT1 chez l'humain est aussi responsable de pathologies graves. En fait, une surexpression de STAT1 serait impliquée dans la promotion de l'inflammation dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Kitamura et al., 1997). Il a été observé chez des patients atteints de sclérose en plaques une augmentation de l'expression du facteur de transcription STAT1 (phosphorylé) dans les lymphocytes T CD8 et CD4 périphériques, ce qui corrèle aussi avec une hausse de l'expression de T-bet (Th1) et de l'IFN- γ étant des médiateurs pro-inflammatoires (Frisullo et al., 2006). De plus, il semble qu'une dérégulation de STAT1 est impliquée dans des maladies ischémiques cardiaques, des cancers, des maladies cœliaques (Zhou et al., 2001; Mazzarella et al., 2003; Ng et al., 2003).

Les souris déficientes en STAT2, comme pour STAT1, sont viables et ont une croissance normale, toutefois leur voie de signalisation des IFNs est affectée. Ce qui conduit aussi à une vulnérabilité aux infections virales (Park et al., 2000). Toutefois, il est nécessaire de noter qu'une déficience en STAT1 aboutit à une interruption de la signalisation des IFNs de type I et II. Par contre, les souris *STAT2*^{-/-} ont uniquement une aberration de la signalisation des IFNs de type I ceci a conduit certains groupes à considérer que STAT2 est un membre atypique et inhabituel de la famille des STATs (Park et al., 1999). Chez l'humain, une diminution de l'expression de STAT2 peut induire des cancers

carcinoïdes et la maladie inflammatoire de l'intestin (Zhou et al., 2001; Mudter et al., 2005).

En absence d'expression de STAT3, les souris subissent une mort embryonnaire (Takeda et al., 1997), ne permettant pas d'études aussi élaborées que pour les STAT1 et 2. Toutefois l'élucidation de la fonction de STAT3 dans les tissus adultes est effectuée en se basant sur un système de recombinaison *Cre-loxP*, permettant l'ablation de STAT3 dans des tissus spécifiques et à un moment plus tardif. Il a été démontré que STAT3 est important pour la signalisation de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*). Dans les lymphocytes T, une réduction de la signalisation de l'IL-6 et l'IL-10 est observée ainsi qu'une prolifération non contrôlée (Chen and Khurana Hershey, 2007). Chez l'humain, une dérégulation de STAT3 a été mise en cause dans le développement de certains cancers et maladies inflammatoires tels que la sclérose en plaques, le psoriasis et les maladies inflammatoires de l'intestin (Hodge et al., 2005; Musso et al., 2005; Frisullo et al., 2006; Gu et al., 2006).

Les souris déficientes en STAT4 sont viables mais ont une altération au niveau de la voie de signalisation de l'IL-12. Ainsi en absence de signalisation de cette cytokine, le développement des lymphocytes Th1 est bloqué, ce qui entraîne un déséquilibre dans le système immunitaire favorisant ainsi la formation de lymphocytes Th2. Par conséquent, la production de l'IFN- γ est affaiblie et l'activité cytotoxique des cellules NK est diminuée (Kaplan et al., 1996). Les patients ayant une dérégulation au niveau de l'expression de STAT4 souffrent de maladies inflammatoires tels que le psoriasis et l'arthrite rhumatoïde (Eriksen et al., 2005; Walker et al., 2006). D'autre part, l'effet inverse est observé lorsque les souris sont déficientes en STAT6. En absence de ce facteur de transcription, la signalisation de l'IL-4 et de l'IL-13 est défectueuse. Ainsi, la différenciation vers le phénotype Th2 est inhibée (discuté à la section 1.4) (Shimoda et al., 1996; Takeda et al., 1996), ce qui aboutit à une diminution des réponses dirigées contre les pathogènes extracellulaires. Des dérégulations de l'expression de STAT6 conduisent à diverses pathologies humaines, dont l'asthme, les allergies inflammatoires, les maladies cardiaques ischémiques et le lymphome de Hodgkin (Ghaffar et al., 2000; Mullings et al., 2001; Skinnider et al., 2002; Satterthwaite et al., 2005).

Malgré leur grande homologie, la distribution des STAT5a et STAT5b dans les tissus est différente, ce qui explique leurs fonctions distinctes. Les souris déficientes pour le

STAT5a ont une altération de la signalisation de la prolactine, ce qui entraîne des problèmes au niveau du développement des glandes mammaires. De plus, les voies de signalisation de l'IL-2 et du GM-CSF sont réduites (Feldman et al., 1997; Liu et al., 1997). Une expression non régulée de STAT5a chez l'humain est la cause de plusieurs maladies tels que les cancers (Li et al., 2004; Nevalainen et al., 2004). L'absence de STAT5b conduit à une perte de la signalisation des facteurs de croissance (GH) chez la souris comme chez l'humain, aboutissant entre autres à des immunodéficiences (Kofoed et al., 2003). Une abolition à la fois des STAT5a et STAT5b conduit à une diminution de la prolifération des lymphocytes T et une absence de cellules NK (voir tableaux 2 et 3).

Tableau 2: Phénotype des souris déficientes pour des molécules STATs

Molécule STAT	Phénotype de souris déficientes
STAT1	Diminution de la signalisation des IFNs Susceptibilité accrue aux infections virales
STAT2	Diminution de la signalisation des IFNs Susceptibilité accrue aux infections virales
STAT3	Mort périnatale, diminution de la signalisation d'IL-6 et d'IL-10
STAT4	Diminution de la signalisation d'IL-12 Polarisation de Th1 affectée
STAT5a	Signalisation de prolactine diminuée
STAT5b	Signalisation de l'hormone de croissance défectueuse, activité NK diminuée
STAT6	Diminution de la signalisation d'IL-4 et IL-13 Polarisation de Th2 affectée

Tableau 3: Les voies de signalisations JAK/STAT empruntées par les cytokines de la classe I et II.

Cytokine	JAK	STAT
Chaîne γc^*		
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	JAK1, JAK3	STAT5a/b, STAT3
IL-4	JAK1, JAK3	STAT6
IL-13	JAK1, JAK2, TYK2	STAT6
Chaîne βc^*		
IL-3, IL-5, GM-CSF	JAK2	STAT5a/b
Chaîne gp130*		
IL-6, IL-11, IL-27, LIF	JAK1, JAK2, TYK2	STAT3
IL-12 ⁺⁺	JAK2, TYK2	STAT4
Homodimériques*		
Hormone de croissance	JAK2	STAT5a/b, STAT3
Prl, Epo, Tpo	JAK2	STAT5a/b
Interférons⁺		
IFN α/β	JAK1 TYK2	STAT1, STAT2
IFN- γ	JAK1, JAK2	STAT1
IL-10 ⁺	JAK1, TYK2	STAT3

Légende : Ce tableau regroupe les cytokines selon leur interaction avec une chaîne commune de leur récepteur spécifique. Seules les molécules JAKs et STATs dont leur activation est la plus assurée ont été incluses. * Cytokines de la classe I. ⁺ Cytokines de classe II. ⁺⁺ IL-12 se lie à un récepteur ayant une chaîne homologue et de la même famille que le gp130.

3.0 La régulation négative de la voie JAK-STAT

L'activité des cytokines impliquant l'induction des cascades biochimiques particulièrement de la voie JAK-STAT est sous haute surveillance. En fait, l'intensité et la durée du signal d'activation déterminent la nature de la réponse cellulaire à des cytokines. Par conséquent, la voie JAK-STAT est soumise à des régulations négatives à différents niveaux afin de réguler l'impact de ces médiateurs. Il existe, au moins, trois familles de régulateurs spécialisés contribuant au blocage des cascades JAK-STAT. Citons : les PIAS (*'Protein Inhibitors of Activated STATs'*), les protéines tyrosine phosphatase (PTP) et la famille des SOCS (*'Suppressors Of Cytokine Signalling'*). Malgré leurs modes d'actions distincts, ces inhibiteurs ont pour but d'assurer un contrôle rigoureux du signal afin d'obtenir la réponse cellulaire adéquate.

3.1 La famille des PIAS

Les PIAS (*'Protein Inhibitor of Activated STATs'*) sont des régulateurs négatifs pour plus de 60 protéines dont la plupart sont des facteurs de transcription citons les STATs. Chez les mammifères, la famille des PIAS est constituée de quatre membres soit les PIAS1, PIAS3, PIASx et PIASy (Schmidt and Muller, 2003; Shuai, 2006). La présence d'isoformes pour ces inhibiteurs augmente la complexité de cette famille. Les protéines PIAS, spécifiquement PIAS1 et PIAS3, ont la capacité de se lier aux molécules STATs et d'empêcher leur interaction avec l'ADN, bloquant ainsi la transcription des gènes cibles. Par contre, PIASx et PIASy peuvent recruter des molécules co-inhibitrices comme les histones déacétylases (HDACs) et donc inhiber la transcription sans interférer dans la liaison des STATs à l'ADN (Wormald and Hilton, 2004). De plus, les PIAS ont la capacité de séquestrer les facteurs de transcription STATs dans des compartiments ou des structures nucléaires (Sharrocks, 2006). Récemment, il a été démontré que tous les membres PIAS sont dotés d'une activité de SUMOylation. Ceci consiste à une modification post-traductionnelle aboutissant à un couplage covalent d'une ou plusieurs protéines SUMO (*'Small Ubiquitin like-Modifier'*) à des lysines des protéines cibles. Ainsi, les molécules STATs ayant subies des modifications ne sont plus aptes à se lier à l'ADN et à l'induction de la transcription des gènes (Kroetz, 2005; Palvimo, 2007).

3.2 Les protéines tyrosine phosphatases (PTP)

Il existe plusieurs types de PTP qui sont impliqués dans la régulation de divers mécanismes dont la voie JAK-STAT; on distingue la famille des SHPs (*'SH2-containing tyrosine phosphatases'*) qui inclut deux membres : SHP1 (ou PTP1C) et SHP2 (ou PTP1D). Ce sont des enzymes cytoplasmiques de types phosphatases caractérisées par la présence de deux domaines SH2. Dans le cas de la voie JAK-STAT, les SHPs sont capables de se lier, par leur domaines SH2, aux résidus de tyrosine phosphorylés localisés sur les récepteurs ou sur les molécules JAKs qui sont sous un état activé (Neel et al., 2003). Ce qui induit un changement de conformation et permet l'activation du domaine phosphatase des SHPs. En conséquent ceci aboutit à une déphosphorylation de leur substrat (Hilton, 1999). Lorsque les molécules SHPs s'associent au récepteur, ce dernier est alors incapable de former les sites d'amarrage et d'interaction des molécules STATs. Dans les minutes qui suivent la liaison d'une cytokine à son récepteur, les molécules SHPs semblent être les premières à agir pour la régulation négative. Il existe aussi d'autres types de tyrosine phosphatases citons les molécules CD45, PTP1B (*'Phospho-Tyrosine Phosphatase 1B'*) et TC-PTP (*'T Cell Protein Tyrosine Phosphatase'*) (Valentino and Pierre, 2006). Une étude récente a démontré l'importance de ces phosphatases dans le contrôle des voies de signalisation. En fait, des embryons de souris doubles mutants *ptp1b^{-/-} tcptp^{-/-}* ont subi une mort embryonnaire (jour 9,5-10,5) ; ceci synchronisait avec une activation constitutive de STAT1 (Heinonen et al., 2009). Certaines études suggèrent une implication particulière de TC-PTP dans la déphosphorylation de JAK1 et de STAT1, alors que JAK2 serait le substrat de l'enzyme PTP1B (Myers et al., 2001; Simoncic et al., 2002; ten Hoeve et al., 2002). Ainsi une abolition de l'une des deux phosphatases affecterait plusieurs voies de signalisation dont celle de l'IFN- γ . La PTPase CD45 est hautement exprimée à la surface des cellules hématopoïétiques et joue un rôle important dans la régulation négative de divers cascades de signalisation (Thomas, 1989). Une étude a démontré que le CD45 peut déphosphoryler, *in vitro*, les quatre membres de la famille des JAK kinases ; JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. De plus, une abolition de l'expression de CD45 entraîne une hyperactivation de la voie JAK-STAT (Irie-Sasaki et al., 2001). Le CD45 serait alors responsable de réguler et de gérer les réponses cellulaires à différents signaux (Penninger et al., 2001).

3.3 La famille des protéines SOCS

3.3.1 Aperçu général

Récemment découvertes, les protéines SOCS (*Suppressors Of Cytokine Signalling*) constituent une famille de régulateurs négatifs intracellulaires formée de huit membres : SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3, SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6, SOCS-7 et CIS (*Cytokine Inducible-SH2 containing protein*) (Starr and Hilton, 1998; Alexander, 2002). Le premier membre à avoir été découvert est CIS ; dans les études initiales il a été démontré qu'il était rapidement induit et qu'il avait inhibé les voies de signalisations de l'IL-3 et de l'érythropoïétine (EPO) (Yoshimura et al., 1995; Matsumoto et al., 1997). SOCS-1, le deuxième membre à être identifié, a été cloné par trois groupes indépendants qui ont démontré qu'une expression forcée de SOCS-1 bloque la signalisation induite par diverses cytokines dépendantes de la voie JAK-STAT (Endo et al., 1997; Naka et al., 1997; Starr et al., 1997). Les SOCS jouent un rôle indispensable dans l'inhibition de la signalisation induite par plusieurs stimuli incluant les cytokines, les hormones de croissance, les ligands des récepteurs Toll, les statines et l'AMPc (*Cyclic Adenosine Monophosphate*) (Ilangumaran et al., 2004). Les SOCS agissent principalement sur les voies de type JAK-STAT. Contrairement aux PIAS et SHPs qui préexistent dans la cellule non activée, les protéines SOCS sont inductibles et ne sont détectées qu'à un niveau basal très faible. En fait, lorsque qu'un dimère STAT est transloqué dans le noyau, plusieurs gènes sont transcrits dont les ARNm des SOCS correspondants qui sont transcrits et traduits de manière très précoce et sont dotés d'un pouvoir d'inhibition des voies de signalisation (Gisselbrecht, 1999).

3.3.2 Structure des protéines SOCS

Tous les membres de la famille des SOCS ont une similarité structurale et fonctionnelle (Dalpke and Heeg, 2003). Ils ont une organisation tertiaire formée d'un domaine SH2 central constitué de 95 acides aminés, flanqué d'une région N-terminale ayant une longueur variable entre 50 et 350 acides aminés peu conservés, puis l'extrémité C-terminale contient un motif appelé « boîte SOCS » formée de 40 acides aminés hautement conservés au niveau des membres de la famille. La région N-terminale des

SOCS-5 à 7 est plus allongée que les autres membres; SOCS-4 a une longueur intermédiaire. D'autre part, au moins une vingtaine de protéines répertoriées chez l'humain et la souris partagent des similarités au niveau de la région de la « boîte SOCS » (Cooney, 2002) tels que les ASB (*'ankyrin-repeat-containing proteins'*), les protéines WSB (*'WD-40-repeat containing proteins'*) et les SSB (*'SPRY domain-containing proteins'*). Toutefois, ces protéines diffèrent au niveau de leur région centrale; le domaine SH2 est attribué spécifiquement aux protéines SOCS (Krebs and Hilton, 2000). Bien que les huit protéines SOCS se ressemblent toutes du point de vue structural, elles peuvent être regroupées en paires en se basant sur leur niveau d'homologie de séquences: CIS et SOCS-2 (45%), SOCS-1 et SOCS-3 (35%), SOCS-4 et SOCS-5 (92%), SOCS-6 et SOCS-7 (57%) (voir Figure 4) (Alexander, 2002). Il est intéressant de noter que les SOCS-1 et SOCS-3 ne semblent pas avoir d'introns. D'ailleurs les membres CIS, SOCS-1, SOCS-2 et SOCS-3 sont les plus étudiés dans la littérature, toutefois nous allons nous concentrer sur les molécules SOCS-1 et SOCS-3 tout en mentionnant les caractéristiques des autres protéines SOCS lorsque les informations sont disponibles.

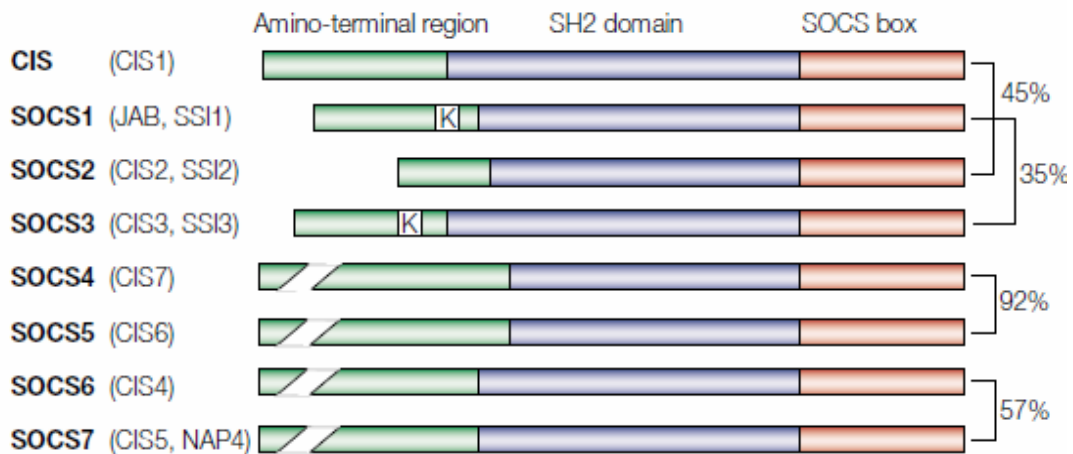


Figure 4: Structure schématique des huit membres de la famille SOCS : Chaque protéine SOCS est formée de trois régions distinctes ; soit l'extrémité N-terminale de longueur variable (en vert), le domaine SH2 (en bleu) et la région C-terminale (ou boîte SOCS) (en rouge), les pourcentages d'homologie entre les protéines SOCS sont aussi mentionnés. Les cases contenant la lettre K indiquent les régions KIR. Tirée de (Alexander, 2002).

Le domaine central SH2 a la propriété de se lier aux motifs de tyrosine phosphorylés sur les protéines cibles (Hilton, 1999). Les membres CIS et SOCS-2 semblent interagir par leur domaine SH2 avec des résidus de tyrosine phosphorylés sur les récepteurs activés (Yoshimura et al., 2007). De cette façon, ces deux inhibiteurs entrent en compétition avec les molécules STATs pour se lier aux récepteurs. SOCS-1 a la capacité d'interagir directement et avec une haute affinité au niveau des molécules JAKs, par l'intermédiaire de son domaine SH2. Citons un des exemples intéressants de la littérature ; SOCS-1 semble avoir une activité suppressive très notable sur la signalisation des IFNs de classe I même à des bas niveaux (Fenner et al., 2006). En fait, SOCS-1 se lie au résidu tyrosine en position 441 du récepteur de type 1 de l'interféron gamma (IFNGR1) d'abord, puis interagit avec la molécule JAK2 et inhibe son activité kinase (Qing et al., 2005). Le domaine SH2 de SOCS-3 est formé d'un motif particulier de 35 résidus appelé « PEST » (*'Proline-, glutamic-acid-, serine- and threonine-rich'*) ou C-ESS (*'C-extended SH2 domain'*) qui est très critique pour l'interaction avec les phosphotyrosines. Ce motif participe à l'activité inhibitrice de SOCS-3 et à sa stabilisation (Babon et al., 2006). Cet inhibiteur se lie plus particulièrement à la tyrosine phosphorylée en position 757 (Tyr 757) des récepteurs ayant la chaîne commune gp130, de plus il se lie au résidu tyrosine en position 800 du récepteur de l'IL-12 (Yamamoto et al., 2003). Le mécanisme d'inhibition par le SOCS-3 peut être favorisé par le contact avec les récepteurs activés et agir comme les CIS et SOCS-2, ou peut directement se lier aux molécules JAKs tout comme le SOCS-1 (Hansen et al., 1999; Nicholson et al., 2000; Sasaki et al., 2003). Toutefois, cette dernière possibilité demeure moins appréciée dans la littérature puisque le SOCS-3 a une faible affinité pour les JAKs, mais peut se lier à proximité de leur domaine kinase (Nicholson et al., 2000; Piessevaux et al., 2008). Des études de mutagenèse ont démontré que les SOCS-1 et SOCS-3 ont une extension de l'extrémité N-terminale du domaine SH2 appelée N-ESS (*'N-terminus Extended SH2 Subdomain'*) et qui est formée de 15 résidus d'acides aminés organisés sous forme d'hélices α . Cette zone est cruciale pour favoriser une solide interaction des SOCS avec les résidus de tyrosine phosphorylés et pour déterminer leur orientation spatiale (Sasaki et al., 1999; Yasukawa et al., 1999; Babon et al., 2006). Récemment, des études ont montré que les SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6 et SOCS-7 possèdent aussi cette région additionnelle du domaine SH2 à son extrémité N-terminale. Cette extension est plus notable en longueur que chez les autres SOCS, elle est formée de 300-400 résidus d'acides aminés. Toutefois, la fonction et la structure exacte de leur région

N-ESS demeure moins connue pour ce groupe de SOCS (SOCS-4, 5,6 et 7) (Bullock et al., 2007).

Les SOCS-1 et SOCS-3 sont les seuls à partager une région en N-terminal appelée KIR (*'Kinase Inhibitory Region'*) et qui est localisée tout près de la séquence N-ESS (Alexander and Hilton, 2004) (voir Figure 4 p.38). Ce domaine est formé de 12 acides aminés et joue un rôle indispensable et crucial dans leurs mécanismes d'inhibition. KIR agit comme pseudo-substrat et empêche l'interaction du domaine catalytique des molécules JAKs avec les STATs (Narazaki et al., 1998; Sasaki et al., 1999). La mutation d'un résidu tyrosine conservé dans la région KIR abolit la capacité inhibitrice des SOCS-1 et SOCS-3 sans affecter leur capacité de liaison aux molécules JAKs. Pour étudier plus en profondeur l'importance du domaine KIR, plusieurs équipes ont développé un peptide Tkip (*'Tyrosine Kinase Inhibitor Peptide'*) de 12 résidus (WLVFFVIFYFFR) mimant l'activité inhibitrice KIR du SOCS-1. Ce peptide est suffisant pour bloquer l'activité de JAK2 et empêche le recrutement des STATs correspondants (Flowers et al., 2004; Waiboci et al., 2007). Dans une des nombreuses études, Tkip a été capable tout comme le SOCS-1-KIR de protéger des souris contre l'infection létale par le poxvirus et ce en bloquant JAK2 (Ahmed et al., 2009). Ceci démontre le rôle critique du domaine KIR et suggère qu'il permet aux SOCS-1 et SOCS-3 d'avoir une activité inhibitrice et une interaction avec les JAKs optimales. Il a été suggéré que le SOCS-5 pourrait avoir un domaine KIR puisqu'il a une séquence proche de Tkip, mais ceci n'a pas encore été testé (Crocker et al., 2008), donc seuls les SOCS-1 et SOCS-3 possèdent un domaine KIR fonctionnel. Comme mentionné précédemment, les SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6 et SOCS-7 possèdent la région N-terminale la plus longue ce qui suggère que ces membres forment un sous-groupe au sein de la famille des SOCS. Peu d'informations sont disponibles quant au rôle de cette région dans ce sous-groupe. Récemment, une étude a démontré que la région N-terminale joue un rôle essentiel dans la localisation nucléaire du SOCS-6. Ce groupe de chercheurs a été le premier à identifier qu'un membre de la famille SOCS peut jouer un rôle fonctionnel dans le noyau (Hwang et al., 2007). Une autre étude a démontré que la région N-terminale du SOCS-5 est nécessaire pour son interaction avec le récepteur EGF-R (*'Epidermal Growth Factor Receptor'*) (Nicholson et al., 2005). Toutefois, ces données demeurent moins élaborées et élucidées dans la littérature.

Subséquentement à leurs interactions avec les phospho-tyrosines des protéines cibles (récepteurs ou JAKs ou STATs etc...), les SOCS inhibent leur activité kinase et bloquent la voie de signalisation correspondante. Or, une troisième étape est nécessaire afin d'achever le mécanisme d'inhibition par les protéines SOCS. Cette dernière est accomplie par le domaine de la «boîte SOCS» à l'extrémité C-terminale (Piessevaux et al., 2006). La «boîte SOCS» permet de marquer les molécules cibles en effectuant leur ubiquitinylation ce qui conduit à leur élimination par le complexe protéolytique du protéasome. La région N-terminale du domaine de la «boîte SOCS» inclut une séquence formée de 10 acides aminés et qui est appelée «boîte BC» (Kibel et al., 1995; Dimitriou et al., 2008). Cette dernière a la particularité de participer à l'interaction avec des protéines de type Elongine B et C. D'autre part, la région C-terminale de la «boîte SOCS» contient un sous-domaine appelé «boîte Cul5» et qui permet de recruter une troisième protéine nommée Culline-5 au complexe SOCS/ Elongin B/ Elongin C (Kamura et al., 1998; Mahrouf et al., 2008). En gros, la «boîte SOCS» est formée de trois hélices α qui entrent en interaction avec l'Elongine C ayant une seule hélice α par des liens hydrophobiques (Dimitriou et al., 2008). Ensuite l'Elongine B stabilise le complexe en entrant en contact avec une région en forme de boucle entre les hélices 2 et 3 de la «boîte SOCS» (Zhang et al., 1999; Bullock et al., 2006). Ce complexe tertiaire recrute la Culline-5 qui à son tour participe à l'interaction avec la protéine Rbx2 (*'RING-box-2'*) (*'RING finger-containing protein'*). Cette dernière stabilise et favorise la liaison du complexe avec l'enzyme E2 ubiquitinase (*'E2 ubiquitin-conjugated enzyme'*). Ainsi, les SOCS/ Elongine B/ Elongine C/Culline 5/ Rbx2/ E2 ubiquitinase forment un complexe qui fonctionne comme l'ubiquitine ligase E3 (Kamura et al., 2004) (voir Figure 5). En conséquence, les protéines cibles sont marquées de manière covalente avec des ubiquitines et sont acheminées au protéasome pour subir la dégradation (Larsen and Ropke, 2002).

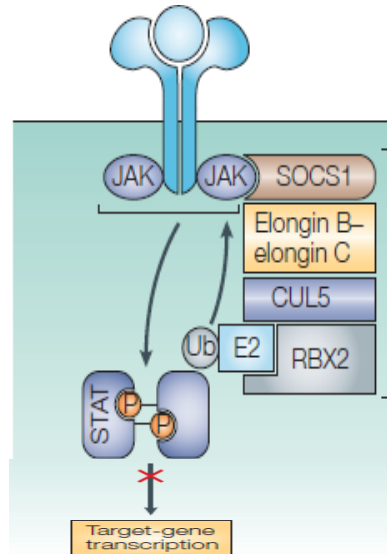


Figure 5: Représentation schématique de l'enzyme E3 ligase. Suite à l'activation de la voie JAK/STAT, les protéines SOCS bloquent la voie de signalisation et provoquent la dégradation des molécules cibles par le protéasome via la « boîte SOCS ». Cette dernière se lie à l'Elongine B et C, Cul5, Rbx2, à l'enzyme E2 pour former la ligase E3, ce qui induit l'ubiquitination des molécules visées. Modifiée de (Liu et al., 2005).

3.3.3 Les fonctions physiologiques des protéines SOCS

Les modèles de souris transgéniques qui ont une surexpression ou une délétion d'un gène codant pour une protéine SOCS spécifique, ont permis d'étudier le rôle de chacun des membres SOCS. Toutefois, les informations au niveau de la littérature sont concentrées sur les membres CIS, SOCS-1, SOCS-2 et SOCS-3.

Les souris qui n'expriment pas CIS ont un phénotype tout à fait normal. Toutefois, une surexpression de CIS entraîne des conséquences plus notables. Dans ce cas, les souris ont un poids inférieur à la moyenne qui est peut-être dû à une signalisation aberrante de l'hormone de croissance (GH) (Ram and Waxman, 1999). Chez les femelles, la surexpression de CIS induit une dérégulation de la signalisation de la prolactine ce qui

entraîne des complications au niveau du développement des glandes mammaires. De plus, les souris transgéniques montrent aussi une sévère diminution du taux des lymphocytes T de type $\gamma\delta$ et de l'activité des cellules NK ainsi qu'une altération de la balance Th1/Th2 (Matsumoto et al., 1999). Il est intéressant de noter que les souris sur-exprimant le CIS ont des problèmes similaires à ceux observés chez les souris qui n'expriment pas le STAT5. Ce qui suggère que le CIS peut réguler les voies de signalisation induites par le STAT5 (Cooney, 2002).

Les souris *SOCS-1^{-/-}* subissent une mort néonatale trois semaines après leur naissance. Plusieurs complications ont été notées : une dégénérescence du foie et une infiltration hématopoïétique massive au niveau de plusieurs organes qui est associée à une inflammation sévère (Starr et al., 1998). Une augmentation de l'apoptose dans les organes lymphoïdes a aussi été observée. De plus, il semble que les lymphocytes T provenant des souris *SOCS-1^{-/-}* sont activés de manière spontanée même dans des conditions sans pathogène (*'pathogen-free'*) (Marine et al., 1999; Naka et al., 2001). En fait, ces problèmes néonataux semblent être causés par une altération au niveau du contrôle de la voie de signalisation de l'IFN- γ . Ces souris deviennent hypersensibles à l'IFN- γ et ont un taux de cytokines élevé dans leur sérum (Brysha et al., 2001). Ceci a rendu les souris très résistantes aux infections virales et parasitaires (Alexander et al., 1999; Bullen et al., 2003; Zimmermann et al., 2006). Un groupe de chercheurs a démontré que des injections d'IFN- γ quotidiennes chez des souriceaux nouveau-nés induisent des complications similaires aux souris *SOCS-1^{-/-}*. De plus, en injectant les souris *SOCS-1^{-/-}* avec un anticorps bloquant l'IFN- γ dès la naissance, elles sont protégées de la mort précoce et de l'infiltration massive des organes (Bullen et al., 2001). Les souris ayant un phénotype *SOCS-1^{-/-} IFN- γ ^{-/-}* ont une apparence saine en début de vie, mais après plusieurs mois, elles succombent à des maladies inflammatoires (Metcalf et al., 2002); ceci implique que le SOCS-1 est aussi responsable du contrôle des voies de signalisation autres que celle de l'IFN- γ . Les lymphocytes T de souris *SOCS-1^{-/-}*, lorsque stimulés avec l'IL-12 ou l'IL-4 ont la capacité de conserver une phosphorylation prolongée et maintenue du STAT4 ou STAT6 respectivement, ceci crée un débalancement exagéré de Th1/Th2 (Fujimoto et al., 2002) (voir section 1.4, p.16). Chez l'humain, une délétion du SOCS-1 a été associée à certains types de cancers tels que les carcinomes hépatocellulaires, les lymphomes et le syndrome myélodysplasique (MDS) (Yoshikawa et al., 2001; Jost et al., 2007).

La fonction *in vitro* de SOCS-2 n'est pas encore bien élucidée, toutefois sa fonction *in vivo* a été bien étudiée via l'utilisation des souris *SOCS-2^{-/-}*. Il a été démontré que les souris déficientes en SOCS-2 ont une apparence saine à la naissance, mais après trois semaines, elles commencent à croître plus rapidement et atteignent un poids plus élevé que la normale. Ces observations suggèrent que le SOCS-2 a un rôle important dans la régulation de la signalisation de l'hormone de croissance et de l'IGF-1 (*'Insulin-like Growth Factor-1'*). Ces souris sont caractérisées par un phénotype de gigantisme dû à une hypertrophie du foie et des organes viscéraux (Metcalf et al., 2000; Leroith and Nissley, 2005).

Deux groupes ont attribué des fonctions contradictoires au SOCS-3. Les souris *SOCS-3^{-/-}* subissent une mort prénatale et les embryons ont une érythrocytose généralisée. A la lumière de ces observations, un premier groupe a suggéré que le SOCS-3 est un régulateur négatif de la voie de signalisation de l'érythropoïétine (EPO) (Sasaki et al., 2000). Par contre, le second groupe a plutôt attribué ces complications à une malformation placentaire et a suggéré que le SOCS-3 joue un rôle important dans la formation du placenta (Roberts et al., 2001). La mort prénatale des souris a compliqué le dénouement du rôle de SOCS-3. Toutefois, les groupes Yasukawa, Croker et collègues ont démontré des rôles distincts et nouveaux en générant des modèles de souris ayant une déficience en SOCS-3 dans les hépatocytes, les macrophages ou les neutrophiles et ce, par la technologie de *Cre-loxP*. Ils ont démontré que le SOCS-3 joue un rôle crucial dans la régulation de la signalisation de l'IL-6, du LIF et des cytokines utilisant le récepteur gp130. En revanche, ces groupes ont montré que SOCS-3 n'est pas essentiel pour la signalisation de l'IL-10 et l'IFN- γ (Croker et al., 2003; Johnston and O'Shea, 2003; Lang et al., 2003; Yasukawa et al., 2003). De plus, le SOCS-3 est impliqué dans l'inhibition de la signalisation du G-CSF (*'Granulocyte Colony-Stimulating Factor'*) et de la leptine (Croker et al., 2004; Howard et al., 2004) (voir Tableau 4).

Tableau 4: Tableau récapitulatif des principaux rôles des SOCS

Molécule SOCS	Phénotype de souris déficientes	Molécules Cibles*
CIS**	Poids inférieur à la normale, dérégulation de la signalisation de la prolactine et de l'hormone de croissance, altération de la balance Th1/Th2	Epo R Prl R leptine R
SOCS-1	Mort néonatale, hypersensibilité à l'IFN- γ	JAK IFNGR1
SOCS-2	Gigantisme, aberration de la signalisation de l'hormone de croissance et de l'IGF-1.	GH R leptine R
SOCS-3	Mort périnatale, dérégulation de la signalisation de l'érythropoïétine, l'IL-6, LIF, G-CSF	gp130 Epo R leptine R IL-12R β 2

Légende : * les molécules cibles suivit de la lettre « R » désignent les récepteurs. ** les souris transgéniques pour CIS ont subi une surexpression, par contre pour les autres molécules SOCS il s'agit d'une déficience.

3.3.4 Importance des SOCS-1 et SOCS-3 dans le système immunitaire

Les protéines SOCS-1 et SOCS-3 sont des régulateurs physiologiques clés au niveau de l'immunité innée et acquise. Les récepteurs *Toll-Like* (TLR) jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des signaux de dangers (endogènes et exogènes) et l'activation de l'immunité innée. Lorsque les TLR sont insuffisamment activés ceci entraîne une susceptibilité élevée aux infections, alors qu'une activation exagérée aboutit à des maladies auto-immunes et à des inflammations chroniques (Dimitriou et al., 2008). Les gènes des SOCS-1 et SOCS-3 sont induits lorsque le TLR4 est activé par le LPS. Le SOCS-1 a la capacité d'interagir directement avec des molécules de la cascade MyD88-dépendante (*Myeloid differentiation factor 88*) citons ; MAL (*MyD88-adaptor-like protein*), IRAK-4 (*IL-1R Associated Kinase 4*) et p65 (sous-unité de NF- κ B) (Ryo et al., 2003; Dimitriou et al., 2008). Le SOCS-3 n'agit pas directement sur la cascade des TLR, mais influence plutôt les effets des médiateurs secondaires. D'ailleurs le SOCS-3 est l'une des protéines les plus exprimées dans les macrophages après leur stimulation avec du LPS. En fait, cet inhibiteur joue un rôle crucial dans la balance entre les activités divergentes des cytokines anti-inflammatoires tel l'IL-10 et les cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-1 et le TGF- β (Yasukawa et al., 2003; El Kasmi et al., 2006).

A l'interface entre l'immunité innée et adaptative, les cellules dendritiques (CD) jouent un rôle indispensable pour connecter ces deux composantes. Les protéines SOCS-1 et SOCS-3 sont impliquées dans l'activation, la différenciation et la maturation de ces cellules (Yoshimura et al., 2007). Dans les CD immatures, la voie de signalisation médiée par STAT6 est constitutivement activée. Toutefois, pendant le processus de maturation, le SOCS-1 est induit et permet d'avoir un changement d'expression des STATs, de sorte que le STAT6 est remplacé par le STAT1 qui est essentiel pour la maturation des CD (Hanada et al., 2003). Le SOCS-1 est aussi responsable de réguler la proportion des sous-populations dérivées des CD. Le SOCS-3 semble être impliqué dans la régulation des cytokines sécrétées par les CD. Le SOCS-3 établit ainsi une balance entre les cytokines permettant la polarisation des cellules T en Th2 ou en Tregs. Une expression forcée du SOCS-3 dans les CD a permis de bloquer la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th17 à cause d'une réduction de la production de l'IL-23 (voir section 1.4, p.16), ce faisant la polarisation des lymphocytes T CD4 vers un profil Th2 a été favorisée (Li et al., 2006). Une telle polarisation des lymphocytes T CD4 a protégé les souris contre certaines

maladies auto-immunes telle que l'EAE (Li et al., 2006). Étonnamment, l'absence du SOCS-3 dans les CD a aussi protégé les souris mais cette fois ci, le mécanisme en cause est plutôt l'induction de l'expansion des cellules Tregs. En fait, en absence du SOCS-3, le STAT3 est toujours en état actif permettant l'induction de l'IL-10 et du TGF- β (Kinjyo et al., 2006; Ogata et al., 2006). Ceci montre l'importance du SOCS-3 dans la balance entre les cellules T CD4 de type Th2 et les cellules Tregs (Yoshimura et al., 2007).

Les SOCS-1 et SOCS-3 jouent un rôle central au niveau de l'immunité adaptative et particulièrement dans le fonctionnement des lymphocytes T. Contrairement aux cellules T périphériques, le SOCS-1 est exprimé abondamment dans les thymocytes surtout dans les cellules doubles positives CD4⁺ CD8⁺. En fait, le SOCS-1 est capable d'assurer la balance des thymocytes simples positifs en régulant la signalisation de l'IL-7 et de l'IL-15 respectivement dans les cellules CD4⁺ et CD8⁺ (Chong et al., 2003; Dimitriou et al., 2008). L'absence du SOCS-1 induit préférentiellement la formation de thymocytes CD8⁺ CD4⁻ (Catlett and Hedrick, 2005).

Tel que mentionné précédemment (section 1.4, p.16), les cytokines IFN- γ , IL-12 et IL-4 sont largement impliquées dans la polarisation des cellules Th (CD4) via l'induction des molécules STAT1, STAT4 et STAT6 respectivement. Toutefois, ces voies de signalisations sont hautement régulées par les SOCS-1 et SOCS-3 afin de préserver la balance des types Th1/Th2. Les lymphocytes Th1 expriment un niveau plus notable du SOCS-1, par contre, le SOCS-3 est plus exprimé dans les lymphocytes de type Th2 (Egwuagu et al., 2002). En fait, lorsque l'IFN- γ ou l'IL-12 sont présents en concentrations élevées dans le milieu extracellulaire, la voie de signalisation IL-4-STAT6 est bloquée par le SOCS-1, ce qui favorise la polarisation vers le type Th1 (Egwuagu et al., 2002). De manière opposée, le SOCS-1 semble aussi bloquer la voie IFN- γ -STAT1, ce qui suggère que le SOCS-1 a le pouvoir d'exercer une suppression mutuelle des Th1 et de Th2 (Yoshimura et al., 2007). Quant au SOCS-3, cet inhibiteur permet de bloquer la voie IL-12-STAT4, ce qui induit une polarisation vers le type Th2 (Seki et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). Les SOCS-1 et SOCS-3 semblent aussi jouer un rôle important dans la polarisation des lymphocytes T CD4 de type Th17. Le SOCS-1 bloque fortement l'effet de l'IFN- γ et conséquemment participe à la promotion de la différenciation des lymphocytes T CD4 en type Th17 (Yoshimura et al., 2007). En revanche, le SOCS-3 a la capacité de bloquer l'effet

de l'IL-6 et l'IL-23 via le STAT3 et donc de réguler négativement le développement des cellules T de type Th17 (Chen et al., 2006).

Au niveau des lymphocytes T CD8, il a été démontré que les souris *SOCS-1^{-/-}* ont une hyper-activation des cellules T CD8 naïves en réponse à l'IL-15. De plus ces cellules T sont aussi plus facilement activées par des ligands du Soi, ce qui entraîne une prolifération excessive et inadéquate et favorise une activité auto-immune délétère. Ces observations démontrent que le SOCS-1 est capable de jouer un rôle important dans la protection contre les maladies auto-immunes (Davey et al., 2005). Une autre étude a aussi démontré que des souris déficientes en SOCS-1 ont un ratio des lymphocytes T CD4 :CD8 perturbé en périphérie. Elles sont caractérisées par une hyper-prolifération des lymphocytes T CD8, CD4 et des cellules mémoires CD8⁺ CD44^{high} qui répondent cinq fois de plus que les cellules témoins à l'IL-15 (Ilangumaran et al., 2003). Bien que le SOCS-3 semble ne pas jouer un rôle majeur dans la régulation du développement des thymocytes, cet inhibiteur est essentiel dans le contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T périphériques en agissant sur leur activation, leur prolifération et leur différenciation (comme discuté plus tôt). Le SOCS-3 régule négativement la voie de signalisation de l'IL-2, une cytokine induisant la prolifération des cellules T (Cohney et al., 1999). De plus des souris déficientes en SOCS-3 sont sujettes à une hyper-sensitivité des cellules T CD8 à l'IL-27 et l'IL-6. Cette étude prouve d'une part l'importance du SOCS-3 dans la régulation de la signalisation des cytokines utilisant le récepteur gp130 et d'autre part sa capacité à limiter la prolifération des lymphocytes T CD8 et de diminuer la possibilité des maladies auto-immunes (Brender et al., 2007b).

3.3.5 Effets neuroprotecteurs des SOCS-1 et SOCS-3

Certains troubles affectant le système nerveux central (SNC) (cerveau et moelle épinière) sont déclenchés et/ou aggravés par l'action des cytokines pro-inflammatoires du système immunitaire. On peut citer la sclérose en plaques (SEP) et l'uvéite humaine qui sont toutes deux caractérisées par une infiltration massive de cellules immunitaires formant ainsi des foyers d'inflammation dans le SNC (Bar-Or et al., 1999). Les modèles animaux suggèrent que les cellules impliquées dans la SEP sont auto-réactives et dirigées spécifiquement contre la gaine de la myéline, composante entourant les axones des

neurones dans le SNC, ainsi que des structures neuronales (Baxter, 2007). Quant à l'uvéïte, les lymphocytes T auto-réactifs entraînent une destruction des photorécepteurs de la rétine (Nussenblatt, 2002). Plusieurs études effectuées sur des modèles animaux de ces maladies suggèrent que les SOCS-1 et SOCS-3 ont des effets neuroprotecteurs, et ce en régulant les voies de signalisation empruntées par les cytokines pro-inflammatoires.

Des études *in vitro* ont démontré que l'IFN- γ a des effets toxiques sur les oligodendrocytes, les cellules productrices de la gaine de myéline, en induisant l'apoptose des cellules en développement et la nécrose de cellules matures (Baerwald and Popko, 1998; Lin et al., 2005). Cette cytokine pro-inflammatoire bloque aussi les tentatives de réparation en interférant au processus de rémyéline (Lin et al., 2006). Des souris transgéniques qui expriment le SOCS-1 sous le contrôle du promoteur d'un gène de la myéline donc spécifiquement dans les oligodendrocytes, ont une diminution de leur sensibilité aux effets délétères de l'IFN- γ sur les oligodendrocytes (Balabanov et al., 2006; Balabanov et al., 2007). Le SOCS-1 a retardé l'apparition des symptômes de l'EAE avec moins d'apoptose des oligodendrocytes (Balabanov et al., 2006; Balabanov et al., 2007). D'autres études ont montré que chez des souris induites pour l'EAE, les niveaux d'expression en ARNm des SOCS-1 et SOCS-3 augmentent notablement dans le cervelet et la moelle épinière lors du pic de la maladie (phase de poussées) puis diminuent avec les phases de rémissions. Ces observations suggèrent que les SOCS-1 et SOCS-3 sont impliqués dans l'atténuation de la sévérité de la maladie (Maier et al., 2002). En comparaison entre deux souches murines les souris SJL ayant la forme cyclique (séries de poussées/rémissions) et les souris C57BL/6 ayant une forme chronique d'EAE, seules les souris SJL ayant des taux élevés des SOCS-1 et SOCS-3 ont eu une meilleure protection (Stark and Cross, 2006). Chez les souris EAU (uvéïte autoimmune expérimentale: modèle animal de l'uvéïte humaine), les SOCS-1 et SOCS-3 participent aussi à la régulation négative des mécanismes immuno-pathogéniques et de l'effet des cytokines pro-inflammatoires (Egwuagu et al., 2006). Des cellules T CD4 transfectées avec des plasmides SOCS-1 et SOCS-3 ont subi une régulation négative des voies de signalisation des cytokines uvéitogéniques soit l'IFN- γ , l'IL-4 et l'IL-12 (Takase et al., 2005). De plus, dans des expériences réciproques, le blocage de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a augmenté l'activité des STATs (Yu et al., 2003; Yu et al., 2004). Ces observations suggèrent que les

niveaux élevés des SOCS dans le SNC sont impliqués dans l'atténuation dégénération de la rétine durant l'EAU.

4.0 L'interféron Béta (IFN- β)

4.1 Caractéristiques de la cytokine

La famille des interférons offre une protection anti-virale; ces cytokines sont capables de perturber la réplication et la prolifération de divers virus (Samuel, 2001). Chez l'humain, cette famille est constituée des IFNs de type I incluant l'IFN- α (plusieurs sous-types existent), l'IFN- β , l'IFN- ϵ , l'IFN- κ et l'IFN- ω , alors que le type II est formé exclusivement de l'IFN- γ , le type III très récemment découvert est composé des IFN- λ_1 (IL-29), IFN- λ_2 (IL-28A) et IFN- λ_3 (IL-28B) (Kotenko et al., 2003; Fensterl and Sen, 2009). La plupart des cellules peuvent induire l'expression de l'IFN- α et l'IFN- β , qui sont les mieux caractérisés parmi ceux de type I, par contre l'IFN- γ est induit par un nombre plus restreint de cellules soit les lymphocytes T et les cellules NK (Katze et al., 2002). Les sections suivantes porteront sur l'IFN- β étant une des cytokines étudiées au cours de notre projet.

L'IFN- β est une protéine globulaire monomérique formée de cinq hélices α , elle a un poids moléculaire de 23 kDa et contient 166 acides aminés (Arnaud, 2002). Les IFNs de type I sont produits principalement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp). De plus, l'IFN- β est également sécrété en grande quantité par les fibroblastes. Néanmoins, toute cellule nucléée, lorsque stimulée de façon adéquate, peut produire de l'IFN- α/β (Malmgaard, 2004; Mathian and Koutouzov, 2008). Les stimuli induisant la production de l'IFN- β sont principalement des molécules microbiennes et du matériel viral; comme les ARN simple brin ou double brin provenant du génome viral ou des intermédiaires de réplication des virus, le lipopolysaccharide (LPS) et les molécules d'ADN comportant des séquences CpG hypométhylées (Bisbal, 2008). La reconnaissance des stimuli se fait par le biais des récepteurs spécifiques PRR (*'Pattern Recognition Receptors'*) dont la famille des TLR (*'Toll-like receptors'*) (TLR3, 4, 7, 8 et 9) et de certains récepteurs intracytoplasmiques; RIG-I (*'Retinoic acid-Inducible Gene I'*) et MAD5 (*'Melanoma Differentiation-Associated gene 5'*) (Mathian and Koutouzov, 2008). Ainsi suite à la reconnaissance des acides nucléiques viraux, la production d'IFN de type α/β est induite.

4.2 Le récepteur de l'IFN- β et la voie de signalisation

Le récepteur des IFN de type I est un hétérodimère formé par les deux sous-unités IFNAR-1 et IFNAR-2 qui se dimérisent après la liaison à l'IFN- β , ce qui le rend fonctionnel. Ce récepteur est partagé par tous les membres des IFN de type I (Biron, 1998; Russell-Harde et al., 1999). Les chaînes IFNAR-1 et IFNAR-2 sont ubiquitaires à la surface de différents types cellulaires (Arduini et al., 1999). Quant aux cellules immunes, il a été démontré que le récepteur des IFN de type I est exprimé en densité élevée sur les PBMC humains, de manière prédominante à la surface des cellules B et des monocytes et en faible quantité sur les neutrophiles (Pogue et al., 2004). L'IFNAR est aussi observé à la surface de la majorité des lymphocytes T soit les cellules T CD8 et CD4. Notons que leur niveau d'expression du récepteur des IFNs de type I est assez bas, mais il est toutefois détectable (Pogue et al., 2004). La chaîne IFNAR-1 est une glycoprotéine de 557 acides aminés qui est capable de lier certains sous-types d'IFN- α . Bien que cette chaîne ne transmette pas les signaux de tous les sous-types d'IFN- α , elle est indispensable pour la formation d'un complexe récepteur fonctionnel. L'IFNAR-2 est capable de lier tous les IFN- α et l'IFN- β , mais est incapable à elle seule de transmettre adéquatement les signaux biologiques (Novick et al., 1994). Récemment, il a été démontré l'existence de trois formes de la chaîne IFNAR-2 résultant d'un épissage alternatif d'un même gène: une forme longue désignée par IFNAR-2c, une forme courte indiquée par IFNAR-2b, et une forme soluble (en faible quantité) nommée IFNAR-2a (Mogensen et al., 1999; Taniguchi et al., 2007). L'IFNAR-2c semble être associée aux éléments de la cascade des IFN- α/β , en revanche les formes IFNAR-2a et IFNAR-2b ont été impliquées dans la suppression de la signalisation de ces IFNs de type I. Donc dans la plupart des cas, le récepteur fonctionnel est formé des sous-unités IFNAR-1 et IFNAR-2c. Les autres sous-unités agissent davantage comme des auto-régulateurs de la signalisation (Pfeffer et al., 1997).

Comme n'ayant pas d'activité enzymatique intracellulaire intrinsèque, le récepteur IFNAR fait appel aux composants de la voie de signalisation JAK-STAT qui sont les acteurs principaux responsables de transmettre les effets des IFNs et de l'IFN- β en particulier (Katze et al., 2002; Plataniias, 2005). La transmission du signal de l'IFN- β fait intervenir deux tyrosines kinases: TYK2 et JAK1 (Pokrovskaja et al., 2005). La TYK2 est constitutivement associée à la chaîne IFNAR-1, alors que la JAK1 est associée à la chaîne

IFNAR-2 (Pellegrini and Schindler, 1993; Chen et al., 2004a). Après la dimérisation du récepteur, les molécules JAK1 et TYK2 subissent une autophosphorylation ce qui crée des sites d'amarrage nécessaires pour le recrutement des molécules STATs. En réponse aux IFNs de type I, les STAT1, STAT2, STAT3 et STAT5 sont activés (STAT4 et STAT6 sont préférentiellement induits par IFN- α) (Darnell et al., 1994; Plataniias, 2005). Les homo- et les hétérodimères constitués des molécules STATs sont transloqués dans le noyau ce qui aboutit à l'induction des gènes stimulés par les IFNs appelés (ISGs) (*'IFN Stimulated Genes'*) (Stark et al., 1998). Un complexe transcriptionnel très important appelé ISGF3 (*'ISG Factor 3'*) est constitué de l'hétérodimère STAT1-STAT2 qui s'associe à une protéine nucléaire IRF-9 (*'IFN-Regulatory Factor 9'*). Ce complexe joue un rôle essentiel dans la médiation de la signalisation des IFN de type I en interagissant avec des séquences ISRE (*'IFN-Stimulated Response Element'*) sur le promoteur des ISGs (Fensterl and Sen, 2009). Malgré l'importance de l'hétérodimère STAT1-STAT2, d'autres complexes peuvent aussi participer à la transduction du signal de l'IFN- β citons : les homodimères STAT1-STAT1, STAT3-STAT3, STAT5-STAT5 et les hétérodimères STAT1-STAT3, STAT1-STAT5, STAT2-STAT3. Ces complexes se lient à des éléments GAS (*'IFN- γ -Activated Site'*) sur les séquences ISRE présentes dans de nombreux gènes (Aaronson and Horvath, 2002; Plataniias, 2005).

4.3 Effets antiviraux de l'IFN- β

Les effets antiviraux directs de l'IFN- β sur une cellule du système inné sont dus à trois voies majeures et classiques: la protéine kinase dépendante d'ARN (PKR), le système 2-5A synthétase/RNase L et les protéines Mx. Cependant, des souris déficientes pour ces trois voies sont toujours capables de développer un état antiviral en réponse à l'IFN, démontrant l'existence de voies alternatives. La PKR est une protéine ayant une activité sérine-thréonine kinase (Clemens, 1997). Elle est induite par l'IFN de type I et son activation est dépendante de la présence d'ARN double brin. Elle est constituée d'un domaine de régulation N-terminal qui contient un site de liaison à l'ARN, et d'un domaine catalytique C-terminal responsable de l'activité kinase (Meurs et al., 1990). Lorsque liée à l'ARN, la PKR est activée et entraîne une inhibition générale de la traduction et une mort cellulaire par apoptose des cellules infectées (Gil and Esteban, 2000). La deuxième voie

antivirale déclenchée par l'IFN de type I est celle du système 2'-5' oligoadénylate synthétase (OAS)/ RNase L. Cette voie multi-enzymatique conduit à la dégradation d'ARN. Deux enzymes fonctionnent en synergie : la 2'-5'A synthétase et la RNase L. Après son activation par de l'ARN double brin, la 2'-5'A synthétase catalyse la polymérisation de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) en oligomères par des liaisons 2'-5' (Espert et al., 2003; Hovanessian and Justesen, 2007). Ces produits (2-5A) se lient à une endoribonucléase latente, la RNase L puis l'activent. Subséquemment, cette dernière catalyse le clivage d'ARNm (cellulaires et viraux) conduisant à l'inhibition de la synthèse protéique et à l'apoptose (Mullan et al., 2005). Les protéines Mx, conservées chez toutes les espèces de vertébrés (Sadler and Williams, 2008), appartiennent à la superfamille des GTPases qui sont capables de lier et d'hydrolyser le GTP. Les protéines Mx sont induites par l'IFN de type I durant une infection. Elles interfèrent avec le développement du virus en modifiant les ARN polymérases nécessaires à la réplication et à la transcription virale (Pavlovic et al., 1992). Les protéines Mx les plus connues sont MxA et MxB humaines. Un des modes d'action de la MxA consiste en une interaction directe de la protéine avec certaines nucléocapsides virales. MxA agit en séquestrant et/ou en redistribuant les nucléocapsides virales au sein de la cellule infectée. Celles-ci ne sont alors plus disponibles pour générer de nouvelles particules virales et, par conséquent, la réplication virale est inhibée (Peltekian et al., 2005). MxA a un large spectre d'activité, elle peut bloquer la réplication de virus à ARN qui sont à simple brin et même des virus à ADN (Ju et al., 2005). Toutefois, aucune activité antivirale n'a été conférée à la protéine MxB, probablement que son rôle réside dans le fonctionnement normal de la cellule (King et al., 2004).

4.4 Rôles de l'IFN- β dans les réponses immunes

Outre leur protection antivirale, les IFN- α/β jouent un rôle fondamental pour favoriser la communication adéquate entre l'immunité innée et adaptative afin de préserver l'intégrité immunologique (Muller et al., 1994). Les IFN- α/β sont largement impliqués dans le développement des différentes fonctions cellulaires, de plus, ils influencent profondément le fonctionnement des branches humorales et cellulaires (Stark et al., 1998). Les IFN de type I sont impliqués dans tous les stades du développement des cellules dendritiques ainsi que dans leur différenciation et leur maturation et ce, en

augmentant l'expression à leur surface des molécules CMH de classe I (surtout) et II ainsi que des molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40) (Coccia, 2008). Les IFNs de type I ont la capacité de promouvoir l'activation et le pouvoir cytotoxique des cellules NK ce qui confère une protection accrue contre les pathogènes (Taniguchi et al., 2001). Les macrophages sont aussi influencés par l'IFN- α/β au niveau de leur développement et leur maturation. En fait ces cytokines confèrent aux macrophages la capacité à sécréter des radicaux libres tel que l'oxyde nitrique en augmentant les taux des enzymes productrices soit les oxydes nitriques synthétases (iNOS) (Taniguchi et al., 2001). Ceci donne aux macrophages une puissante cytotoxicité contre les divers pathogènes. Il semble que ces IFN soient impliqués dans la redistribution cellulaire permettant de favoriser une localisation adéquate des cellules du système inné et une meilleure protection anti-microbienne (Biron et al., 1998). Les études ont démontré l'importance de l'IFN- α/β dans le développement et le fonctionnement des lymphocytes B et T. Ces cytokines viennent à la rescousse des lymphocytes T menacés d'apoptose. En fait après l'élimination d'une infection, les cellules T subissent une mort en masse pour que le système immunitaire retrouve son homéostasie. Toutefois, la mémoire immunologique est préservée grâce à l'IFN- α/β sécrété par les cellules stromales qui entrent en contact avec les cellules T mémoires (Pilling et al., 1999). Ces cellules T sont donc protégées de l'apoptose. L'IFN- α/β est capable de balancer entre l'effet anti-apoptotique et pro-apoptotique en contrôlant les molécules Fas, Bax, Bak et les caspases. De plus, l'IFN- α/β augmente l'action cytotoxique des cellules T CD8 ainsi que leur capacité anti-tumorale et ce, en augmentant l'expression de la protéine membranaire TRAIL (*Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing ligand*).

4.5 L'IFN- β comme thérapie immuno-modulatrice

4.5.1 Propriétés cliniques de l'IFN- β

L'IFN- β a une grande importance au niveau clinique, puisqu'il est utilisé comme thérapie standard chez les patients atteints de la SEP (sclérose en plaques). Cliniquement l'IFN- β est administré sous deux formes: IFN- β -1a et IFN- β -1b, commercialement connues sous le nom de Avonex^{md} /Rebif^{md} et Betaferon^{md} respectivement. L'IFN- β -1b a été la

première forme développée pour l'usage clinique, elle est administrée aux patients de façon sous-cutanée et est produite par un système d'expression bactérien (Markowitz, 2007). Notons que cette forme est non glycosylée. Toutefois, il existe deux formulations pour l'IFN- β -1a, la première est administrée par injection musculaire (IM), alors que la seconde est sous-cutanée (SC). Ces deux formulations sont glycosylées et produites par des lignées de cellules eucaryotes (cellules d'ovaires d'hamster chinois) (Markowitz, 2007). Les deux formes d'IFN- β ont des effets *in vitro* et *in vivo* assez similaires (Goodin, 2005). L'IFN- β est surtout administré aux patients ayant la forme cyclique de la SEP caractérisée par des périodes de poussées et de rémissions, d'ailleurs cette forme est la plus fréquente. L'IFN- β permet de freiner la progression de la maladie, de diminuer la fréquence des récives, de réduire le nombre et le volume des lésions cérébrales mises en évidence par imagerie par résonance magnétique (IRM) (Paty and Li, 1993; Jacobs et al., 1996; 1998; Li and Paty, 1999). Le type d'administration (intra-musculaire ou sous-cutanée) et la dose dépendent de la formulation du médicament ; les patients s'injectent une seule dose ou jusqu'à deux ou trois doses par semaine (Avonex^{md}, Betaseron^{md} et Rebif^{md} respectivement) (Curtiss, 2007). L'IFN- β -1b (Betaferon^{md}) est administré à chaque deux jours (SC) pour une dose de 250 μ g donc un total hebdomadaire de 850 μ g. L'IFN- β -1a (IM) (Avonex^{md}) est injecté à chaque semaine avec une dose de 30 μ g, par contre l'IFN- β -1a (SC) (Rebif^{md}) est administré trois fois par semaine et chacune des doses est de 44 μ g (Markowitz, 2007). Certaines études ont montré que tous ces produits d'IFN- β ont une efficacité similaire, par contre d'autres ont mis en évidence certaines variations. Les taux d'IFN- β mesurés au niveau du sérum des patients atteints de la SEP traités appartiennent à des intervalles de 120 à 475 UI/ml (Khan et al., 1996). Les effets secondaires les plus fréquents causés par l'IFN- β consistent en des symptômes pseudo-grippaux accompagnés de douleurs musculaires et de la fièvre. Ces symptômes disparaissent 24 heures après l'injection. Toutefois l'incidence de développer ces symptômes est plus faible avec l'IFN- β -1a qui est proche de 50% versus 75% pour l'IFN- β -1b (Bermel and Rudick, 2007). De plus, des réactions inflammatoires peuvent se développer aux sites d'injection surtout dans le cas d'une administration sous-cutanée (Bermel and Rudick, 2007). Ces effets secondaires peuvent souvent être contrôlés de façon efficace par des médicaments analgésiques et antipyrétiques (paracétamol, acétaminophène). Il est important que les patients sous traitement subissent une évaluation de la fonction hépatique de façon régulière. En fait, la

réduction de la posologie ou l'abandon du traitement devrait être envisagé si les taux d'alanine-aminotransférase (ALT) sont 5 fois plus élevés que la normale (Durelli et al., 1998; Francis et al., 2003).

4.5.2 Mécanismes d'action de l'IFN- β

Pendant les réponses antivirales, l'IFN- β favorise la co-stimulation et la prolifération cellulaire pour l'élimination efficace et rapide des pathogènes viraux, comme discuté à la section précédente. Mais lorsque les cellules des patients deviennent chroniquement et artificiellement exposées au traitement, elles semblent répondre de manière inverse. Comme immunomodulateur, lorsque l'IFN- β est injecté aux patients, il est capable de réduire la présentation antigénique au niveau des CPA (cellules dendritiques, macrophages, microglies...). L'expression des CMH-II à leur surface est fortement diminuée ce qui rend peu probable l'activation des lymphocytes T par leur TCR (Chofflon, 2005). Les molécules de co-stimulation telles que les CD28, CD80, CD40 sont réduites sur les CPA ce qui implique aussi moins d'activation des lymphocytes T (Qin et al., 2006; Markowitz, 2007). L'IFN- β injecté a le pouvoir de diminuer la prolifération des cellules T. De manière intéressante, l'IFN- β réduit les effets néfastes des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN- γ qui participent à l'aggravation de la maladie. En fait, l'IFN- β est impliqué dans la diminution des réponses immunitaires de type Th1 et permet de promouvoir le profil Th2 (Noronha et al., 1993). Par conséquent, la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10 est favorisée (Karp et al., 2001). Une diminution du nombre de lésions et des foyers d'inflammation nouvellement formés a été observé par IRM chez les patients traités avec de l'IFN- β . Une étude très récente a démontré que les patients atteints de la SEP non traités avec l'IFN- β ont un niveau d'expression d'IL-23 notablement plus élevé que ceux qui ont reçu le traitement standard de l'IFN- β (Durelli et al., 2009). Ces observations suggèrent que l'IFN- β a la capacité non seulement de diminuer les réponses Th1, mais aussi de bloquer le développement des cellules T de type Th17 qui jouent un rôle crucial au niveau la SEP et de l'EAE (Durelli et al., 2009). D'autre part, les niveaux d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, sont augmentés rapidement après l'injection de l'IFN- β ce qui confère une protection (Krakauer et al., 2008). L'IFN- β atténue la transmigration des cellules T à travers la barrière hémato-

encéphalique (BHE), donc amoindri leur accumulation au sein du système nerveux central (SNC) et leurs effets néfastes. En fait, l'IFN- β diminue le niveau d'expression des molécules d'adhésion tels que le VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) et l'ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) ce qui empêche l'interaction des cellules T et des monocytes avec la BHE (Bermel and Rudick, 2007). D'ailleurs ces molécules sont d'une importance cruciale étant la première étape nécessaire qui permet aux cellules immunitaires de franchir la BHE (Oppenheimer-Marks et al., 1991). L'IFN- β bloque l'effet de diverses chimiokines et de protéines métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui sont sécrétées par les cellules inflammatoires tels que les lymphocytes T et les macrophages infiltrants. Les MMP sont capables d'affecter l'intégrité de la BHE en s'attaquant à ses composants majeurs tel que le collagène IV (Sastre-Garriga et al., 2004; Markowitz, 2007). Les effets bénéfiques de l'IFN- β sur les fonctions suppressives des cellules sont moins connus. D'ailleurs, certaines voies de signalisation inflammatoires sont moins régulées au sein des cellules immunes des patients atteints de la SEP que chez les témoins. L'IFN- β , peut en partie restaurer ces mécanismes de régulation, toutefois les mécanismes impliqués sont peu élucidés (Markowitz, 2007). Très récemment, des études ont montré des liens possibles entre l'IFN- β et les protéines SOCS. Un groupe de chercheur a démontré que l'IFN- β est capable d'induire les SOCS-1 et SOCS-3 dans une lignée d'astrocytes primaires (cellules gliales critiques pour l'homéostasie du SNC). L'augmentation de l'expression de ces inhibiteurs a régulé négativement la production et l'effet des cytokines pro-inflammatoires sur les astrocytes. De plus, les SOCS-1 et SOCS-3 ont diminué le chimiotactisme des cellules T vers les astrocytes puisque ces dernières ont réduit leur production de chimiokines (Qin et al., 2008). Les IFNs semblent être avantageux et sont utilisés dans le traitement de plusieurs maladies. L'IFN- α est la thérapie actuelle de choix pour les patients atteints de maladies virales chroniques telle que l'hépatite C. Ce traitement déclenche une diminution de la réplication virale, une induction d'un état antiviral dans les cellules non infectées, une augmentation de la lyse des cellules infectées et une inhibition de la fibrogenèse hépatique (Thomas et al., 1999).

5.0 L'interleukine-27 (IL-27)

5.1 Caractéristiques de la cytokine

L'IL-27 est une cytokine récemment découverte et considérée comme membre de la famille de l'IL-12 à cause de certaines similarités structurelles. L'IL-27 est une protéine hétérodimérique formée de deux sous-unités soit p28 et EB13 (*'Epstein-Barr virus-Induced gene 3'*) étant homologues aux sous-unités p35 et p40 respectivement qui sont les composants de l'IL-12 (Devergne et al., 1996; Pflanz et al., 2002). Les sources principales de l'IL-27 sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) soit les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les microglies activées. Notons que l'IL-27 est synthétisé de manière très précoce par ces cellules en réponse à divers stimuli particulièrement lorsque les PAMPs se lient à leur TLR respectif (Pflanz et al., 2004). L'EB13 est fortement induit par les TLR2, TLR4 et TLR9; l'attachement des ligands pour ces TLRs active la cascade intracellulaire MyD88-dépendante, ceci aboutit au recrutement des facteurs NF- κ B et PU.1 qui se lient au promoteur du gène codant pour EB13 (Wirtz et al., 2005). La synthèse de la sous-unité p28 peut être induite suite à l'activation des TLR3 et TLR4. L'activation via TLR3 déclenche la voie TRIF qui recrute IRF3 (*'Interferon Regulatory Factor 3'*) et permet la production de l'IFN- β . Cette dernière agit de manière autocrine pour induire la sous-unité p28. Tandis que le TLR4 a la capacité de recruter MyD88, ce qui entraîne l'engagement des facteurs NF- κ B et c-Rel qui participent à la synthèse de p28. De plus, l'IFN- γ peut aussi contribuer à l'expression de p28 (Liu et al., 2007).

5.2 Le récepteur de l'IL-27 et la voie de signalisation

Le récepteur de l'IL-27 est formé de deux chaînes polypeptidiques. La première chaîne est nommée WSX-1, cette appellation provient du motif protéique WSXWS trouvé à l'extrémité C-terminale de plusieurs récepteurs de classe I. Cette chaîne peut être aussi désignée par TCCR (*'T Cells Cytokine Receptor'*) ou IL-27RA. La deuxième chaîne du récepteur à l'IL-27 (IL-27R) est la gp130 (Pflanz et al., 2004). Le WSX-1 est spécifique pour la liaison à l'IL-27 par contre, la chaîne gp130 est commune à divers complexes récepteurs reconnaissant les cytokines tels que l'IL-6, l'IL-11, le CNTF (*'Ciliary*

neurotrophic factor'), le LIF (*Leukemia inhibitory Factor*'), l'OSM (Oncostatine M) et le CT-1 (Cardiotrophine-1) (Matsui et al., 2009). L'IL-27R est exprimé à la surface de différentes cellules immunitaires soit les cellules NK, les monocytes, les CD, les lymphocytes T et B, les mastocytes et les cellules endothéliales. Il existe une homologie de la chaîne WSX-1 chez l'humain et chez la souris qui est proche de 63% (Sprecher et al., 1998). L'ARNm codant pour WSX-1 est exprimé à des niveaux très faibles dans tous les tissus (incluant la moelle osseuse et le cerveau), mais à niveaux plus élevés dans les tissus lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques et leucocytes du sang périphérique). Chez les souris, l'ARNm codant pour le TCCR est plus notable chez les lymphocytes T CD4 que les T CD8 particulièrement après une activation par réaction leucocytaire mixte (MLR) (Sprecher et al., 1998).

Comme la plupart des récepteurs de cytokine de classe I, le récepteur de l'IL-27 lorsqu'activé, induit les voies de signalisation JAK/STAT. Toutefois, ces informations ont été obtenues surtout à partir d'observations dans le modèle de la souris. La transmission du signal suite à la liaison de l'IL-27 à son récepteur fait intervenir les molécules JAK1, JAK2 et TYK2 qui s'auto-phosphorylent et entraînent le recrutement des molécules STAT1, STAT2, STAT3 et STAT5 dépendamment du contexte (Yoshida and Yoshiyuki, 2008). Le STAT1 interagit particulièrement avec WSX-1 puisqu'ils partagent des séquences d'acides aminés communes alors que, le STAT3 semble être activé par la chaîne gp130 (Yoshida and Yoshiyuki, 2008). L'activation des STAT2 et STAT5 dépend de STAT1, d'ailleurs des souris déficientes en STAT1 ont une réduction de l'activation des ces facteurs de transcription (Kamiya et al., 2004). Dans la littérature, les informations sont plus élaborées sur les effets obtenus suite à l'activation des STAT1 et STAT3, nous allons discuter de ces effets particulièrement dans le système immunitaire dans la partie ci-dessous.

5.3 Rôles de l'IL-27 dans les réponses immunes

L'IL-27 est une cytokine immuno-modulatrice aux multiples facettes qui agit sur diverses cellules du système immunitaire. Rappelons que la grande majorité des études ont été établies chez la souris, très peu de données sont disponibles au niveau des cellules humaines. L'induction de STAT1 via WSX-1 par l'IL-27 joue un rôle très important au niveau de la polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs en cellules de type Th1 chez la

souris et chez l'humain (Lucas et al., 2003; Larousserie et al., 2004). Dans des modèles de souris, il a été démontré que le STAT1 est capable d'induire particulièrement le facteur de transcription T-bet et d'induire l'expression du récepteur IL-12 β 2. La présence de ce récepteur rend les cellules sensibles à la stimulation par l'IL-12 et de cette façon elles deviennent aptes à la production de l'IFN- γ qui est l'une des cytokines critiques du profil Th1 (Takeda et al., 2003; Kamiya et al., 2004). Des souris déficientes en WSX-1 ont une diminution du niveau de synthèse de l'IFN- γ (Chen et al., 2000), ce qui explique la grande susceptibilité des souris aux infections par des pathogènes intracellulaires dont *Leishmania major* et *Listeria monocytogenes* qui nécessitent des réponses de type Th1 pour leur élimination (Yoshida and Miyazaki, 2008). Avant la synthèse de l'IL-12 par les CPA, c'est l'IL-27 qui est en charge d'assurer la différenciation des cellules T CD4 en cellules de type Th1, et ce, en induisant une augmentation de l'expression des molécules ICAM-1 à la surface des lymphocytes T CD4 naïfs murins selon la cascade STAT1-dépendante, ceci conduit à l'activation de la voie ICAM-1/LFA-1/ERK 1/2 (Owaki et al., 2005). De manière intéressante, l'IL-27 a aussi la capacité d'induire le facteur de transcription T-bet dans les cellules T CD8 de sorte qu'elles acquièrent les propriétés cytolytiques (Tc1) en augmentant l'expression de granzyme B (Morishima et al., 2005). Récemment, il a été démontré chez la souris que l'IL-27 via WSX-1 peut inhiber l'expression du facteur de transcription GATA3 qui joue un rôle pivot dans la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en cellules de type Th2, ceci favorise davantage la polarisation en Th1 (Lucas et al., 2003). Plusieurs études ont impliqué l'IL-27 dans le développement des maladies autoimmunes dans les modèles murins citons l'arthrite rhumatoïde et l'EAE. Par exemple, l'administration d'anticorps neutralisant la sous-unité p28 de l'IL-27 a notablement atténué la sévérité de ces maladies (Goldberg et al., 2004a; Goldberg et al., 2004b).

Malgré les études précédentes, plusieurs observations très récentes sont venues appuyer fortement le pouvoir anti-inflammatoire et immuno-modulateur de l'IL-27. Deux groupes ont montré que des souris *WSX1*^{-/-} infectées avec des protozoaires intracellulaires *Trypanosoma cruzi* et *Toxoplasma gondii* ont pu développer des réponses de lymphocytes T de type Th1 protectrices. Des lymphocytes T CD4 isolés de ces souris ont montré une hyper-activation et une surproduction de cytokines pro-inflammatoires tels l'IFN- γ , le TNF et l'IL-6, ce qui a aboutit à une destruction d'organes comme le foie (Hamano et al., 2003; Villarino et al., 2003). *In vitro*, l'IL-27 a pu supprimer la production des cytokines (IFN- γ)

par les lymphocytes T activés (Yoshimura et al., 2006). En fait ces deux études ont élucidé l'autre face de l'IL-27/WSX-1 qui joue un rôle essentiel dans la prévention d'une inflammation excessive qui aboutit à une destruction fatale des organes et donc à des maladies auto-immunes. Ainsi l'IL-27 joue le rôle d'immuno-modulateur capable d'atténuer la production de cytokines pro-inflammatoires chez des cellules différenciées (Yoshida and Yoshiyuki, 2008). L'étude qui a montré que les souris *WSX1^{-/-}* sont susceptibles à *L. major* à cause d'une diminution de l'IFN- γ (décrite plus haut) a été interprétée différemment par un autre groupe qui montre l'effet anti-inflammatoire de l'IL-27. Ils considèrent qu'il y a eu une augmentation des niveaux de l'IL-4 due à une absence du contrôle par l'IL-27-STAT1 par manque de WSX-1. Ceci a favorisé les cellules T de type Th2 et une suppression subséquente des effets des cellules de type Th1 (Artis et al., 2004). Un autre point fort est que l'IL-27 est capable d'inhiber la production d'IL-2 et d'induire l'expression du SOCS-3 dans les lymphocytes T CD4 de souris ce qui peut diminuer les réponses inflammatoires (Owaki et al., 2006b; Villarino et al., 2006). Ceci expliquerait la cause pour laquelle des cellules T *WSX1^{-/-}* présentent une surproduction d'IL-2. De plus, il a été démontré que l'IL-27-STAT1 inhibe la polarisation des lymphocytes T CD4 en Th17 et altère donc la production des cytokines de type IL-17 fortement impliquées dans des maladies auto-immunes. En fait des souris *WSX1^{-/-}* présentent une aggravation plus notable des symptômes de l'EAE à cause d'une augmentation du taux de Th17 encéphalogéniques (Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006; Fitzgerald et al., 2007a). Le groupe Diveu et collègues ont aussi démontré l'importance de l'IL-27 en induisant l'EAE chez des souris *IL-27-p28^{-/-}*; ces souris ont développé des symptômes plus sévères à cause de la présence de taux élevés de cellules Th17. D'autre part le même groupe a observé que l'IL-27 induit une inhibition de la polarisation des cellules T CD4 en Th17 chez l'humain et ce en bloquant le facteur de transcription ROR γ t via un mécanisme STAT1-dépendant (Diveu et al., 2009). Très récemment, trois groupes ont démontré la capacité de l'IL-27-STAT1-STAT3 à promouvoir la production de l'IL-10, cytokine connue pour ses effets anti-inflammatoires. Ils ont aussi observé que les cellules T provenant de souris *WSX1^{-/-}* produisent des quantités très minimes d'IL-10 (Awasthi et al., 2007; Stumhofer et al., 2007). De manière intéressante, il semble que l'IL-27 a transformé les cellules murines quelque soit leur profile Th1, Th2 ou Th17 en cellules productrices d'IL-10 appelées «*immunosuppressive T*

regulatory type 1-like cells». De plus un de ces groupes a montré que les souris *WSX1*^{-/-} développent une EAE plus sévère, alors qu'un ajout exogène de l'IL-27 a diminué ces symptômes en bloquant l'effet néfaste des cellules de type Th17 (Fitzgerald et al., 2007b). Donc d'après ces observations, on remarque l'effet immuno-modulateur de l'IL-27 qui diminue la pathogenèse de l'EAE tout comme l'IFN- β (discuté à la section 4.4). Ces observations suggèrent que cette cytokine pourrait éventuellement être utilisée comme thérapie immuno-modulatrice dans des maladies telle que la SEP (Fitzgerald and Rostami, 2009). D'ailleurs une étude très récente montre que l'IL-27 a pu induire l'expression des SOCS-1 et de SOCS-3 dans les lymphocytes T CD4 suite à l'activation des STAT1 et STAT3. Ainsi, l'IL-27 serait impliqué dans l'inhibition du développement des cellules de type Th17 murines via entre autres l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 (Qin et al., 2009).

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Hypothèse

Les SOCS-1 et SOCS-3, membres de la très récente famille des « *Suppressors of cytokines signalling* » (SOCS), sont responsables d'assurer un contrôle rigoureux de l'effet des cytokines sur les cellules et ce, par régulation négative de la voie JAK/STAT. Il a été démontré que les SOCS-1 et SOCS-3 sont des éléments clés au niveau de l'immunité innée et adaptative et sont impliqués dans plusieurs maladies du système immunitaire. Toutefois, très peu d'informations sont disponibles quant à l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T humains. D'autre part, l'IFN- β et l'IL-27, deux cytokines ayant des activités immuno-régulatrices, ont des effets bénéfiques via la diminution de l'inflammation chez les patients atteints de la sclérose en plaques ou chez son modèle animal, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Certaines études ont montré un lien entre ces deux cytokines et les protéines SOCS dans des lignées cellulaires ou chez des modèles animaux. Ainsi à la lueur de ces informations, nous postulons que :

L'IFN- β et l'IL-27 ont des effets immuno-modulateurs engendrés par l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T humains.

Objectifs

- 1) Examiner l'effet aigu de l'IFN- β sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau de l'ARNm dans les lymphocytes T CD8 et CD4 humains.
- 2) Evaluer l'effet d'une exposition chronique et répétée à l'IFN- β sur l'expression des SOCS-1 et -3 au niveau de l'ARNm dans les lymphocytes T CD8 et CD4 humains.
- 3) Etudier l'effet de l'IL-27 sur l'expression au niveau de l'ARNm des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 et CD4 humains.
- 4) Mesurer l'effet de l'IFN- β et l'IL-27 sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau protéique dans les lymphocytes T CD8 et CD4 humains.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.0 Isolement des cellules sanguines humaines

1.1 Isolement des cellules mononucléaires périphériques

Du sang périphérique de donneurs sains a été recueilli dans des tubes sous-vide de 10 cm³ VACUTAINER® contenant de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada). Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par centrifugation dans un gradient de densité constitué d'un mélange de polymères polysaccharidiques et d'un composé iodé dense, le métrizamide [Ficoll]. (Ficoll-Plaque PlusTM- GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suède). Pour ce faire, le sang a été pré-dilué avec un volume équivalent de tampon de phosphate salin (PBS) (137 mM NaCl (Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada), 2,7 mM KCl (Wisent), 4,3 mM Na₂HPO₄ (Wisent) et 1,47 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)), contenant 2mM d'EDTA (Wisent) [PBS-EDTA], qui a la propriété d'empêcher l'aggrégation des cellules. Une fois le sang dilué, il a été distribué dans des tubes stériles de 50 ml (Corning, distribué par Fisher Scientific Ltd., Nepean, ON, Canada) (35 ml/tube). Ensuite le Ficoll a été ajouté au fond du tube (13 ml/tube) sous le sang dilué. Les tubes ont été centrifugés à une vitesse de 863 x g pendant 30 minutes (accélération moyenne et décélération sans freinage). Le sérum constituant la couche supérieure dans le tube a été éliminé, tandis que la population de PBMC juste en dessous du sérum a été récoltée et transférée dans des tubes de 50 ml afin de procéder au lavage des cellules. Les étapes de lavage sont importantes afin d'éliminer le Ficoll qui peut devenir toxique après une exposition prolongée pour les cellules. Tous les lavages ont été effectués avec du PBS-EDTA. La première centrifugation a été exécutée à une vitesse de 624 x g pendant 15 minutes, puis les deux subséquentes pendant 10 minutes à une vitesse de 423 x g. Après chaque lavage, les surnageants ont été éliminés, alors que les culots cellulaires ont été resuspendus avec du PBS-EDTA. Un compte cellulaire des PBMC obtenues a été effectué en utilisant un hémacytomètre. Le volume de PBMC adéquat pour le comptage a été dilué avec du Trypan Bleu 0.16% (p/v) (+PBS) (Wisent) afin d'éliminer les cellules mortes du comptage.

La formule utilisée pour le calcul du nombre de cellules est:

$$\text{Nombre total de cellules} = M \times \text{facteur de dilution} \times V \times 10^4$$

M = Moyenne du nombre de cellules (provenant d'au moins de deux chambres de l'hémacytomètre)

V = Volume total des cellules en suspension

A la fin du dernier lavage, les PBMC ont été resuspendues dans du tampon MACS (décrit plus bas) afin de procéder à la séparation des lymphocytes T CD8 et CD4 ou des monocytes (voir ci-dessous).

1.2 Séparation des lymphocytes T CD8, CD4 et des monocytes (CD14)

Les PBMC ont été resuspendues dans du tampon MACS [PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent)] et filtrées afin d'éliminer les agrégats (pores : 70 µm) (BD). Ensuite une centrifugation a été effectuée à une vitesse de 216 x g pendant 10 minutes. Cette étape permet l'exclusion des plaquettes qui peuvent bloquer les colonnes de séparation. Tous les isolements de populations leucocytaires ont été effectués par une sélection positive étant donné que nous désirions des populations ayant la plus grande pureté possible pour des analyses d'expression géniques par PCR en temps réel. Ces expériences ne permettent pas d'éliminer des cellules contaminantes de nos analyses. En fait, nous étions conscients de la possibilité d'induire certains signaux aux cellules. Toutefois, le but de nos expériences était d'abord d'évaluer l'effet des cytokines, donc les niveaux de base étaient les mêmes pour toutes les conditions. Les lymphocytes T CD8 ont été isolés avant les lymphocytes T CD4 à cause de leur plus faible proportion dans le sang. Pour ce faire, les PBMC ont été resuspendues dans un volume adéquat de MACS (900µl de MACS pour 10X10⁷ de cellules) et incubées avec des billes magnétiques couplées à des anticorps spécifiques anti-CD8 (10 µl billes pour 10X10⁷ de cellules) (Miltenyi Biotech Inc., Auburn, CA, États-Unis). L'incubation a duré 15 minutes à 4°C. Les billes non liées aux cellules ont été éliminées par un lavage dans du tampon MACS à 423 x g pendant 10 minutes. Pendant ce temps, les colonnes LS (Miltenyi) nécessaires à la séparation cellulaire ont été hydratées avec 3 ml de tampon MACS. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 0,5 ml de MACS et déposés sur les colonnes retenues par un support aimanté. La force magnétique exercée par le support permet de retenir les cellules-cibles munies de billes

dans la colonne. Trois lavages successifs ont été accomplis afin d'éliminer les cellules non liées aux anticorps (anti-CD8). Finalement les cellules cibles ont été obtenues en collectant la fraction positive. Pour ce faire, la colonne a été retirée du support magnétique et 5 ml de tampon MACS ont été ajoutés, ainsi, en exerçant une pression dans la colonne, les cellules cibles ont été récoltées et lavées. Dans le but d'obtenir une meilleure pureté, les cellules de la fraction positive ont été centrifugées à $423 \times g$ pendant 10 minutes puis resuspendues de nouveau dans 0,5 ml de tampon MACS. Ensuite ces cellules ont été repassées dans une deuxième colonne LS en suivant la procédure décrite précédemment. Afin d'isoler les cellules T CD4, un compte cellulaire de la fraction négative (cellules CD8-) a été effectué pour ajouter les volumes de MACS et de billes anti-CD4 (Miltenyi) adéquats. La procédure de séparation des cellules T CD4 était identique à celle des cellules T CD8 (décrit ci-dessus). Finalement les cellules T CD8 et CD4 obtenues ont été comptées et resuspendues dans du R-10 pour procéder à la stimulation. R-10 : [(RPMI 1640 (Wisent) contenant 10% (v/v) FBS (Wisent), de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (Wisent) (100 µg/ml), et de la L-glutamine (Wisent) (2mM)]. Il est nécessaire de mentionner qu'une sélection positive des lymphocytes T CD4 pourrait induire une certaine activation au niveau des cellules (Julius et al., 1991), sauf que tous nos résultats ont été comparés avec des lymphocytes T CD4 non stimulés ayant subi la même procédure d'isolement. Donc, l'activation qui se produit dans les cellules avec ou sans traitement est égale, ainsi le rapport des réponses est toujours équivalent peu importe l'intensité de l'activation. D'autre part, certaines études considèrent qu'une sélection positive avec un anti-CD4 n'enrichi pas uniquement des cellules T CD4. Toutefois, la quantité de billes magnétiques utilisée a favorisé la sélection de cellules T CD4+ en absence de cellules CD4+ CD14+. En fait, l'analyse par cytométrie de flux les populations obtenues tant pour le profil volume (FSC-*Forward Scatter*) et la granulation des cellules (SSC-*Side Scatter*) a bien démontré qu'il s'agit de lymphocytes T. Ceci a été confirmé par un marquage avec les fluorochromes montrant une identité CD3+ CD4+.

La séparation des monocytes a été faite dans des expériences n'interférant pas à l'isolement des lymphocytes T. La procédure suivie pour isoler les monocytes a été identique à celle utilisée pour obtenir les cellules T, toutefois les billes magnétiques utilisées étaient couplées aux anticorps anti-CD14 (Miltenyi). Après récolte et lavage avec

du tampon MACS, les cellules ont été resuspendues dans un milieu de culture complet afin de les différencier en cellules dendritiques (voir ci-dessous).

Un aliquot (2×10^5 cellules) de chacune des sous-populations isolées (CD8, CD4 et CD14) a été conservé afin de vérifier leur pureté par cytométrie en flux (voir ci-dessous).

2.0 Essai fonctionnel sur les lymphocytes T et monocytes

2.1 Stimulation des lymphocytes T (CD8 et CD4)

Dans le but d'étudier l'expression des « *Suppressor Of Cytokine Signalling-1* » et « *Suppressor Of Cytokine Signalling-3* » (SOCS-1 et SOCS-3) en réponse à l'IFN- β / IL-27, les cellules T CD8 et CD4 purifiées ont été resuspendues dans un volume de R-10 et la concentration cellulaire a été ajustée à 2×10^6 cellules/ml. Les cellules ont été distribuées dans des tubes «snap cap» et pré-chauffées à 37°C dans un bain-marie pendant 5 minutes. Ensuite, les cytokines en question ont été ajoutées aux cellules. L'étape de pré-chauffage permet de s'assurer que les cellules sont déjà à la température optimale afin d'induire rapidement l'expression de SOCS-1 et SOCS-3, une fois les cytokines ajoutées.

L'étude des effets de l'IFN- β (Invitrogen, Burlington ON, Canada) sur les molécules SOCS-1 et SOCS-3 était divisée en trois sections, d'abord nous avons effectué une cinétique, en second lieu, nous avons évalué la dose réponse pour l'induction de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 et enfin nous avons effectué une exposition répétée de l'IFN- β sur les cellules T CD8 et CD4. Les cinétiques d'expression des molécules SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à l'IFN- β ont été effectuées par des incubations de différentes durées soit 30, 60, 120, 180 et 240 minutes en présence de 1 000 U/ml d'IFN- β . Tandis que la dose réponse de SOCS-1 et SOCS-3 a été établie par des incubations avec différentes concentrations d'IFN- β : 10, 100, 1 000 et 10 000 U/ml pendant une durée de 60 minutes (pic d'expression) à 37°C. L'exposition répétée des lymphocytes T CD8 et CD4 à l'IFN- β consistait à l'ajout de cette cytokine en dose physiologique (100 U/ml) à chaque 48 heures. L'expression au niveau de l'ARNm des SOCS-1 et SOCS-3 a été analysée une heure après chacune des stimulations, en comparaison avec le témoin correspondant non stimulé. Les différences au niveau de la viabilité des cellules sont alors négligeables. Plus précisément, il y avait 6 conditions pour les cellules du même donneur soit : Tube 1- Cellules témoins non traitées à l'IFN- β ; Tube 2- Cellules stimulées avec une dose d'IFN- β pendant 1 heure; Tube 3- Cellules gardées avec une dose d'IFN- β pour 48 heures; Tube 4- Cellules stimulées avec une deuxième dose d'IFN- β pendant 1 heure de temps et ce après 48 heures d'incubation; Tube 5- Cellules ayant reçu deux doses d'IFN- β et incubées pendant 96

heures; Tube 6- Cellules incubées avec une troisième dose d'IFN- β et ceci pendant 1 heure de temps après 96 heures d'incubation. Rappelons que toutes ces conditions ont été effectuées à 37°C.

Pour étudier l'effet de l'IL-27 (Cedarlane, ON Canada) sur les molécules SOCS-1 et SOCS-3, nous avons établi une cinétique et une dose réponse des profils d'expression de ces deux molécules. La cinétique a été effectuée par l'incubation des cellules T CD8 et CD4 avec l'IL-27 (100 ng/ml) pendant une heure vs. trois heures de temps à 37°C. Alors que pour la dose réponse, trois concentrations ont été utilisées : 10, 100 et 250 ng/ml pour une durée de 1 heure (pic d'expression) à 37°C.

Pour toutes les expériences décrites plus haut, la récolte des cellules a été suivie d'un lavage au PBS pour éliminer le milieu enrichi (R-10). Après l'aspiration du surnageant, les culots ont été conservés à -80°C jusqu'au moment de l'extraction d'ARN (voir ci-dessous).

2.2 Génération *in vitro* de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains

Dans le but d'obtenir un bon témoin positif pour SOCS-1 et SOCS-3 nous voulions générer des cellules dendritiques (CD) à partir de monocytes isolés (section 1.2 p.68) (adapté de (Xia and Kao, 2003)). Notons que cette technique de génération de CD est utilisée de façon routinière dans le laboratoire. Les monocytes ont été resuspendus (2×10^6 cellules/ml) dans du R-10 auquel les éléments suivants ont été ajoutés : 100mM pyruvate de sodium, 10mM d'acides aminés non-essentiels (Wisent) et 50 μ M de 2- β -mercaptoéthanol (Sigma). Les cellules resuspendues ont été transférées uniquement dans les puits centraux (1 ml/puit) d'une plaque de 24 puits, tandis que les puits périphériques ont été remplis de PBS et ceci pour minimiser l'évaporation du milieu de culture. Ensuite les cellules ont été incubées avec les cytokines IL-4 (Interleukine-4) (20 ng/ml) et GM-CSF ('*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*') (100ng/ml) (Cedarlane) pendant 3 jours à 37°C. Après la période d'incubation, la partie supérieure du milieu (400 μ l) a été enlevée et du nouveau milieu de culture contenant les cytokines (IL-4 (20 ng/ml) et GM-CSF (100ng/ml)) a été ajouté. Une autre incubation de trois jours à 37°C a été nécessaire. Au jour 6, nous avons induit la maturation des cellules dendritiques en ajoutant du lipopolysaccharide 100 ng/ml (LPS provenant d'*Escherichia coli* sérovar 0111:B4 (Sigma,

ON, Canada)) pour 6 heures à 37°C. Ces cellules dendritiques ont d'ailleurs été utilisées comme témoins positifs pour d'autres expériences dans le laboratoire, donc il se peut qu'une stimulation de 6 heures avec du LPS ne soit optimale mais suffisamment forte pour que ces cellules soient un bon témoin positif dans notre étude. Ainsi, après la maturation, le milieu de culture a été aspiré. Les cellules ont été récoltées dans du PBS froid puis lavées à 423 x g pendant 10 min et les culots conservés à -80°C pour l'extraction de l'ARN (voir ci dessous).

2.3 Vérification de la pureté cellulaire (T CD8, CD4 et monocytes)

Suite à l'isolement des cellules (T CD8, T CD4 et monocytes) à l'aide des billes magnétiques, (comme décrit à la section 1.2, p.68), la pureté des cellules obtenues a été vérifiée à chacune des expériences. Les cellules qui ont eu un taux de pureté inférieur à 92% n'ont pas été prises en considération. Pour ce faire, chaque aliquot (2×10^5 cellules) a été incubé avec l'anticorps spécifique couplé à un fluorochrome et dilué dans du tampon FACS (PBS contenant 1% (v/v) de FBS (sérum bovin foetal) et 0,1% (w/v) NaN_3) dans un volume total de 50 μ l. L'incubation s'est faite pendant 30 minutes à 4°C et à la noirceur. Afin d'éliminer les anticorps non liés, les cellules ont été lavées une fois avec le même tampon. Les lymphocytes T CD8 ont été marqués avec l'anti-CD8 PE, les T CD4 ont été incubés avec l'anti-CD4 PB et les monocytes ont été incubés avec l'anti-CD14 FITC. Notons qu'il n'était pas nécessaire d'utiliser des contrôles isotypiques pour chacun des anticorps puisque les expériences de routine effectuées dans notre laboratoire montrent toujours que le bruit de fond est négligeable. En d'autres termes ces anticorps utilisés ont une spécificité de reconnaissance très élevée de leur molécule cible. Après le marquage, les cellules ont été fixées avec 1% (v/v) de formaldéhyde dans du PBS (0,2 ml) (Fisher Scientific Compagny, ON, Canada). Les cellules ont été passées au cytomètre de flux LSR II (BD Biosciences). L'analyse des données a été effectuée par le logiciel FlowJo (Treestar, San Carlos, CA) (détails fluorochromes voir tableaux 5 et 6).

Tableau 5: Fluorochromes utilisés en cytométrie de flux

Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Filtres optiques
Phycoérythrine (PE)	488	575/26
Pacific Blue™ (PB)	405	440/40
Isothiocyanate Fluorescéine (FITC)	488	530/30

Légende : Tableau regroupant les fluorochromes utilisés pour la visualisation d'anticorps spécifiques au cytomètre de flux, les longueurs d'ondes (nm) nécessaires pour leur excitation et les filtres optiques utilisés.

Tableau 6: Anticorps utilisés en cytométrie de flux

Anticorps	Quantité en (µg/ml) par marquage	Source
CD8 (PE)	3	BD Biosciences
CD4 (PB)	200	BD Biosciences
CD14 (FITC)	50	BD Biosciences

Légende: Tableau regroupant les anticorps utilisés et leur fluorochrome correspondant, ainsi que la quantité adéquate pour le marquage (µg/ml) et la source commerciale.

3.0 Evaluation de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 par PCR en temps réel

3.1 Extraction de l'ARN total

L'extraction de l'ARN total des cellules T CD8, CD4 et des CD a été effectuée en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) et en suivant la procédure fournie par le manufacturier. Les cellules conservées à -80°C ont été dégelées à température pièce puis les culots cellulaires ont été lysés avec un tampon de lyse RLT (contenant du thiocyanate de guanidine) (ajout de $350\ \mu\text{l}$ de RLT pour moins de 5×10^6 cells ou $600\ \mu\text{l}$ pour $5 \times 10^6 - 10 \times 10^6$ de cellules). Chacun des lysats cellulaires a été passé 5 à 6 fois dans une seringue de 1 ml *RNase-free* (BD Biosciences) munie d'une aiguille de calibre 20 (0,9 mm de diamètre). Un volume d'éthanol 70% égal au volume de RLT a été ajouté aux lysats cellulaires et bien mélangé pour former une solution homogène. Ces volumes ont été déposés sur des colonnes *RNase-free* munies d'un tube collecteur (fourni avec la trousse) et puis les colonnes ont été centrifugées à $10\ 000 \times g$ pendant 15 secondes. Si le volume des échantillons dépassaient $700\ \mu\text{l}$, cette étape a été répétée. Le volume obtenu dans le tube collecteur a été éliminé. Ensuite, un second tampon RW1 a été ajouté dans les colonnes puis ces dernières ont été centrifugées à $10\ 000 \times g$ pendant 15 secondes. Le liquide dans les tubes collecteurs a été éliminé. Un troisième lavage a été effectué en ajoutant $500\ \mu\text{l}$ du tampon RPE ($10\ 000 \times g$ pendant 15 secondes). De nouveau le volume dans les tubes collecteurs a été rejeté. Un autre lavage avec du tampon RPE ($500\ \mu\text{l}$) a été effectué à une vitesse de $10\ 000 \times g$ pendant 2 minutes. Afin de s'assurer que les colonnes ont été débarrassées des différents tampons de lavage, elles ont été transférées dans de nouveaux tubes collecteurs puis centrifugées pendant 1 minute à une vitesse maximale. La dernière étape consistait à l'élution de l'ARN total. Pour ce faire, les colonnes ont été transférées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml (*RNase-free*). De l'eau *RNase-free* ($40\ \mu\text{l}$) a été ajoutée dans les colonnes, ensuite ces dernières ont été centrifugées pendant 1 minute à $10\ 000 \times g$. Le dosage des ARN totaux a été déterminé en utilisant un spectrophomètre Ultrospec 2 100 pro à une longueur d'onde de 260 nm. Alors que la pureté a été évaluée par un ratio des densités optiques obtenues à 260 et 280 nm. Les ratios 260/280 obtenus étaient supérieurs à 1,6. Les ARN totaux ont été congelés à -80°C jusqu'à leur transcription en ADN complémentaire (ADNc) tel que décrit dans la section suivante.

3.2 Génération de l'ADN complémentaire (ADNc)

L'ADNc a été synthétisé à l'aide du *Quantitect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) en suivant la procédure décrite par le manufacturier. En première étape, il était nécessaire d'éliminer l'ADN génomique contaminant. Pour cela, l'ARN total (1 µg) a été brièvement incubé pendant 2 minutes à 42°C avec un tampon *gDNA wipeout buffer* (2 µl) et avec de l'eau *RNase-free* (volume total de 14 µl). Ensuite, les enzymes responsables de la transcription inverse (Omniscript® et Senscript® Reverse Transcriptases (RT)) ont été ajoutées en présence d'inhibiteurs de RNase ainsi que des dNTPs, des amorces aléatoires et oligo-dT et des sels. La synthèse d'ADNc a été effectuée pour 30 minutes à 42°C, puis une étape de 3 minutes à 95°C a inactivé les enzymes. Les ADNc ont été conservés à -20°C afin de procéder avec la technique de PCR en temps réel (voir ci-dessous).

3.3 PCR en temps réel ('*Real time- Polymerase Chain Reaction*')

La méthode de PCR en temps réel qui a été utilisée est basée sur l'activité 5' exonucléase d'une ADN polymérase thermostable (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase). Cette dernière a la propriété de cliver une sonde interne Taqman durant le PCR. La technique de PCR a été effectuée en utilisant deux amorces complémentaires à chacune des extrémités 5' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Ainsi, l'ADN polymérase a synthétisé le brin complémentaire via l'élongation des amorces dans le sens 5'→3' d'une séquence exactement complémentaire du brin d'ADN. En plus, une sonde interne de type Taqman a été utilisée, son extrémité 5' était munie d'un fluorochrome (reporteur) et son extrémité 3' était marquée par un agent supprimeur (quencher) qui inhibe l'émission de fluorescence par le reporteur lorsqu'ils sont à proximité. Durant l'élongation, lorsque la sonde interne est liée à sa séquence cible, l'ADN polymérase effectue un clivage de la sonde. Ceci aboutit à la séparation du reporteur et du supprimeur, donc à l'émission de la fluorescence. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée au cours de la réaction de PCR à chacun des cycles.

La technique de PCR en temps réel a été utilisée pour évaluer l'expression en ARNm de deux gènes soit : SOCS-1 et SOCS-3, alors que l'ARN ribosomal 18S a été utilisé comme contrôle endogène (Applied Biosystems, Foster City, CA, États Unis). Les

ADNc préparés et conservés à -20°C ont été dégelés sur glace. Un même échantillon d'ADNc a été transféré dans des trois tubes Eppendorf ($2,3 \mu\text{l}/\text{tube}$), correspondant aux trois réactions de PCR citées ci-dessus. Les produits nécessaires au PCR ont été ajoutés à ces échantillons selon les consignes du manufacturier ($55,2 \mu\text{l}/\text{tube}$). Ces cocktails de différents produits ont été fraîchement préparés à l'abri de la lumière et contenaient du *Universal PCR master mix* (25 mM d'ADN polymérase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase), 10 mM de dNTP, 15 mM de MgCl_2 , un fluorochrome passif et référence interne (ROX™ dye), les amorces spécifiques (18S, SOCS-1 ou SOCS-3) et de l'eau stérile. Pour l'amplification du gène ribosomal 18S, deux amorces ont été ajoutées soit : l'amorce sens et l'amorce anti-sens (50nM) ainsi que de la sonde interne marquée d'un fluorochrome VIC™ et du suppresseur TAMRA™ dye (200 nM). Les cocktails spécifiques aux gènes SOCS-1 et SOCS-3 contenaient les amorces 3' et 5' (45 nM) et la sonde interne spécifique marquée par un fluorochrome FAM™ ainsi qu'un quencher non fluorescent (Applied Biosystems) (Taqman® MGB) ($12,5 \text{ nM}$). En plus de nos échantillons à l'étude, un témoin positif formé d'ADNc de cellules dendritiques stimulées avec du LPS pendant 6 heures (section 2.2, p.72) (échantillon non dilué et une dilution 1/5 ont été préparés) a été considéré comme calibrateur sur chacune des plaques de PCR. Un contrôle négatif (eau stérile) a été utilisé pour vérifier l'absence d'un signal non spécifique. Les ADNc ont été bien mélangés avec les cocktails correspondants puis transférés en duplicats ($25 \mu\text{l}/\text{puit}$) dans une plaque 96 puits (Applied Biosystems). Les bulles d'air ont été éliminées puis la plaque a été centrifugée à $160 \times g$ pour quelques secondes afin de s'assurer que le volume total de l'échantillon était au fond du puits. La réaction de PCR a été effectuée dans un appareil Fast Real Time PCR System 7900HT (Applied Biosystems). La plaque a été incubée à trois conditions cycliques avec différentes températures. A la première phase, la plaque a été exposée pendant 2 minutes à 50°C . Cette étape a pour but d'activer l'Uracil-DNA Glycosylase (UNG) afin d'empêcher l'amplification de contaminants d'une expérience antérieure. L'UNG a été inactivée lors de l'étape suivante (à 95°C). A la deuxième phase, la plaque a été exposée à une température de 95°C pendant 10 minutes, ce qui a permis de séparer complètement les brins de l'ADNc. Les étapes de dénaturation-hybridation-élongation ont été répétées pour 40 cycles : dénaturation 15 secondes à 95°C , hybridation + élongation à 60°C pendant 1 minute.

Pour l'analyse, l'expression relative de chacun des gènes cibles (SOCS-1 et SOCS-3) a été comparée au gène ribosomal 18S et ceci pour standardiser les résultats obtenus. Pour ce faire nous avons tout d'abord calculé la moyenne du nombre de cycles obtenus au niveau de chaque duplicata et l'écart-type. Lorsque l'écart-type était trop élevé ($> 0,8$ représentant 1 cycle de différence) l'échantillon était répété dans une autre ronde de PCR. L'expression relative des gènes cibles a été comparée au témoin (18S). Ainsi, nous avons effectué la différence entre le nombre de cycle moyens obtenus pour le gène cible et le témoin selon la formule suivante : $\Delta C_T = C_{T(\text{cible})} - C_{T(\text{témoin})}$. Ensuite, nous avons calculé le $\Delta\Delta C_T$ qui représente la différence entre le ΔC_T du gène cible et la moyenne des ΔC_T du témoin positif pour le même gène : $CTL\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{échantillon})} - \Delta C_{T(\text{témoin positif})}$. Les résultats obtenus ont été transformés en puissance selon la formule: $2^{-CTL\Delta\Delta C_T}$ afin de comparer des résultats obtenus sur plusieurs plaques.

4.0 Evaluation de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau protéique par immunocytochimie

Des PBMC ont été isolées à partir de donneurs sains tel que décrit à la section 1.1 (p. 67). Après avoir éliminé les plaquettes (section 1.2, p.68), les culots de PBMC ont été resuspendus avec du R-10 afin d'obtenir 2×10^6 cellules/ml. Nous avons stimulé ces cellules soit avec l'IFN- β ou avec l'IL-27 pendant 3 heures de temps à 37°C. De plus, nous avons gardé des cellules témoins (sans stimulation) ayant confronter les mêmes conditions que les cellules stimulées (incubation, lavages etc.). Donc, une fois resuspendues, les cellules ont été distribuées dans trois tubes « snap cap » afin d'être stimulées ou non avec l'une ou l'autre des cytokines citées ci-dessus. Nous avons utilisé une dose de 1 000 U/ml d'IFN- β et une concentration de 250 ng/ml d'IL-27 pour les stimulations. Ces concentrations ont été jugées optimales pour l'induction des SOCS-1 et de SOCS-3 au niveau protéique en comparaison avec les données d'expression en ARNm. Après la période d'incubation, 1×10^6 cellules ont été récoltées dans des Eppendorf et lavées avec du PBS. Ces cellules ont été centrifugées à 400 x g pendant cinq minutes. Les culots ont été resuspendus avec du RPMI 1640 + 50% FBS (Wisent) de telle sorte à avoir 1×10^6 cellules/ml dans chacun des tubes. Ensuite nous avons procédé à l'immunocytospin (StatSpin Cytofuge 2, distribué par Fisher Scientific). Cette manipulation consiste à catapulter les cellules sur des lames lorsqu'elles sont soumises à une vitesse élevée. Pour ce faire, nous avons procédé au montage du matériel requis. Nous avons placé la lame (*Superfrost/Plus* de Fisher Scientific, Etats-Unis) (format 25 x 75 x 1.0mm) correspondante sur une plaque de fixation. Ensuite nous avons placé le concentrateur cellulaire formé de trois puits et muni d'un caoutchouc par-dessus la lame. Le montage a été comprimé avec des pinces. Enfin les concentrateurs entièrement montés ont été installés en position inclinée vers le centre du rotor. Nous avons ajouté les cellules (100 μ l/puits) dans les puits les plus espacés dans le but d'empêcher une contamination, puis centrifugé à 5 00 x g pendant 4 minutes. Les lames ont été séchées à température pièce pendant 10 minutes. Ensuite, les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) 2% (p/v) dans du PBS (Sigma) pendant 10 minutes suivi de trois lavages de cinq minutes avec du PBS. Les lames ont été gardées à 4°C avec le même tampon pour procéder ensuite au marquage des cellules tel que décrit plus bas.

D'abord nous avons perméabilisé les cellules en trempant les lames dans une solution de PBS + 0,3% de Triton X-100 (Sigma), et ce pendant 30 minutes à température pièce. Ensuite nous avons rincé les lames avec du PBS trois fois pendant cinq minutes, chaque zone cellulaire (puits) a été délimitée en traçant un cercle autour avec un crayon hydrophobe DAKO. En deuxième lieu, nous avons inclus une étape de blocage en ajoutant une solution de HHFH (200 µl/puits) [(1mM Hepes, 2% (v/v) sérum de cheval (décomplémenté 30min à 56°C), 5% (v/v) sérum foetal de bovin (décomplémenté 30min à 56°C), solution saline Hank's HBSS 1X et 0,1% (p/v) de sodium azide (Wisent)] et ce, pendant une heure tout en gardant les lames dans une chambre humidifiée à température pièce. Cette étape permet de diminuer le bruit de fond et les liaisons non spécifiques des anticorps. Ensuite les solutions d'anticorps primaires dilués dans du HHFH ont été ajoutées aux puits correspondants (200 µl/puits). Nous avons utilisé les anticorps monoclonaux spécifiques pour les molécules humaines SOCS-1 (clone 4H1, 25 µg/ml) et SOCS-3 (clone 1B2, 20 µg/ml) (Millipore Upstate distribué par Cedarlane, ON Canada). La détection spécifique des SOCS-1 et de SOCS-3 a été comparée, en parallèle, avec des cellules mises en présence d'un isotype correspondant soit un anticorps IgG1 de souris (même concentration finale que l'anticorps) (voir tableau 7, p.82). L'incubation avec les anticorps primaires a duré toute la nuit dans une chambre humidifiée et à 4°C. Le lendemain, les lames ont été lavées avec du PBS trois fois pendant cinq minutes puis l'anticorps secondaire, un sérum polyclonal de chèvre biotinylé (2 µg/ml) (Invitrogen) reconnaissant spécifiquement des immunoglobulines de souris (voir tableau 7) a été ajouté. L'incubation a duré deux heures et ce, en gardant toujours les lames dans une chambre humidifiée à température pièce. Enfin, nous avons ajouté dans chacun des puits une solution de Streptavidine conjuguée au Cy3 (2 µg/ml) (Medicorp Inc, Qc, Canada). Afin de détecter aussi des sous-types de lymphocytes T, nous avons ajouté à la Streptavidine-Cy3 des anticorps reconnaissant les cellules T CD8 ou CD4 respectivement soit avec l'anticorps monoclonal de lapin anti-CD8 humain (10 µg/ml) (Vector Laboratories, Burlingame CA, États-Unis) ou le monoclonal de rat anti-CD4 humain (10 µg/ml) (Lifespan Biosciences, Seattle WA, États-Unis). Des puits contrôles étaient aussi nécessaires pour vérifier la spécificité des anticorps. Donc un autre mélange a été préparé formé de la Streptavidine-Cy3 et des isotypes correspondants; soit des immunoglobulines de lapin (Jackson ImmnoResearch Laboratories Inc. West Grove PA, État-Unis) et un isotype de rat-IgG1

(BD). Cette solution a été gardée deux heures dans une chambre humidifiée à température pièce (TP) (voir tableau 7). Après les lavages, nous avons ajouté respectivement un sérum polyclonal de chèvre conjugué à l'Alexa-488 dirigé contre des immunoglobulines de lapin (2 µg/ml) (Invitrogen) ou un sérum polyclonal d'âne conjugué au FITC dirigé contre des immunoglobulines de rat (2 µg/ml) (Jackson ImmnoResearch Laboratories Inc.). Une incubation était nécessaire tel que décrit ci-dessus. Finalement, nous avons marqué les noyaux avec une solution de Hoechst 33342, trihydrochloride, trihydrate (2 µg/ml) (Invitrogen, Molecular Probe) pour une durée de 10 minutes à température pièce. Après les lavages, les lames ont été montées avec du Gelvatol [20% (p/v) glycérol (Gibco), 10% (p/v) polyvinyl alcohol dans du 0,1 M Tris-HCl pH 8-8.3] comme agent de montage. Les lames ont été séchées pendant toute la nuit à l'abri de la lumière à 4°C avant leur observation.

Les lames ont été observées en utilisant un microscope à fluorescence (Leica DM6000). Ce microscope est doté de trois spectres optiques, donc les couleurs Hoechst (bleu), FITC/A488 (vert) et Strep-Cy3 (rouge) ont été visualisées pour chaque champ. Nous avons comparé l'expression des SOCS-1 et de SOCS-3 dans les cellules non stimulées vs. celles qui ont été traitées avec l'IFN-β ou l'IL-27. Pour ce faire, nous avons visualisé plusieurs champs (4-5) et nous avons compté les cellules T exprimant ou non SOCS-1 et SOCS-3.

5.0 Représentation graphique et analyses statistiques des données expérimentales

Les résultats que nous avons obtenus par PCR en temps réel et par immunocytochimie ont été représentés sous forme d'histogrammes réalisés à l'aide du logiciel de calcul GraphPad Prism version 4.0 (La Jolla, Californie, Etats-Unis). De plus, dans le but de mettre en évidence une validité statistique au niveau de nos résultats, nous avons eu recours à la méthode du test *t de Student* (non paramétrique) effectuée de manière pairée, ce qui a aussi été réalisé par le même logiciel cité ci dessus. De cette façon, nous avons pu vérifier l'existence d'une expression différentielle de SOCS-1 ou SOCS-3 dans des cellules non traitées en comparaison avec cellules qui ont été stimulées avec l'une des cytokines d'intérêt (IFN-β ou IL-27).

Tableau 7: Anticorps utilisés en immunocytochimie

Antigène ciblé ou réactif	Hôte	Concentration (µg/ml)	Isotype	Source commerciale *
SOCS-1 humain	Souris	25	Souris IgG1	Millipore <i>BD</i>
SOCS-3 humain	Souris	20	Souris IgG1	Millipore <i>BD</i>
IgG souris	Chèvre (biotinylé)	2		<i>BD</i>
Streptavidine-Cy3		2		Medicorps Inc
CD8 humain	Lapin	10	Lapin IgG	Vector Laboratories <i>Jackson ImmnoResearch</i>
CD4 humain	Rat	10	Rat IgG	Lifespan Biosciences <i>BD</i>
IgG lapin	Chèvre (conjugué Alexa488)	2		Invitrogen
IgG Rat	Chèvre (conjugué FITC)	2		Jackson ImmnoResearch

Légende : Tableau regroupant les anticorps utilisés, les concentrations ajoutées, la nature des anticorps avec chacun des isotypes correspondants et la source commerciale. * *la source commerciale en italique correspond à l'isotype.*

RÉSULTATS

1.0 Effets de l'IFN- β sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3

1.1 L'IFN- β induit rapidement l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T humains.

1.1.1 Cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau de l'ARNm par les lymphocytes T CD8 et CD4.

Afin d'étudier la cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3, les lymphocytes T CD8 et CD4 ont été purifiés à partir de PBMC obtenues d'au moins 5 donneurs sains pour chacune des conditions. Les cellules ont été stimulées avec 1 000 U/ml d'IFN- β et récoltées après 30, 60, 120, 180 et 240 minutes. L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été évaluée au niveau de l'ARNm et ce par PCR en temps réel. Les niveaux de SOCS dans les lymphocytes T ont été standardisés par rapport à l'ARN ribosomal 18S puis comparés aux taux des SOCS obtenus au niveau du témoin positif soit les cellules dendritiques (CD). Ces dernières ont montré un taux élevé d'expression en ARNm de ces deux molécules. L'ADNc des CD codant pour le SOCS-1, nécessitait en moyenne uniquement huit cycles de PCR pour être détecté, alors que pour le SOCS-3, 10 cycles d'amplification étaient requis pour être visualisé par rapport au témoin l'ARN ribosomal 18S. L'ADNc obtenu des CD traitées au LPS a été utilisé comme gabarit sur chacune des plaques de PCR en temps réel, nous permettant ainsi de compiler les données de plusieurs donneurs effectués à différents moments.

L'IFN- β a augmenté très rapidement l'expression des ARNm codant pour les SOCS-1 et SOCS-3 par les lymphocytes T CD8 (Figures 6A et B). Les deux graphiques démontrent qu'une rapide augmentation en ARNm a été détectée dès 30 minutes pour atteindre l'expression maximale après 60 minutes de stimulation. Ensuite, l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a diminué progressivement à partir de 120 minutes pour atteindre des niveaux similaires ou même plus bas que l'expression basale. En comparant le niveau des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules non stimulées (nil) vs. au pic d'expression (60 minutes), nous remarquons que l'augmentation d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 induite par l'IFN- β était statistiquement significative à 60 minutes. Les niveaux

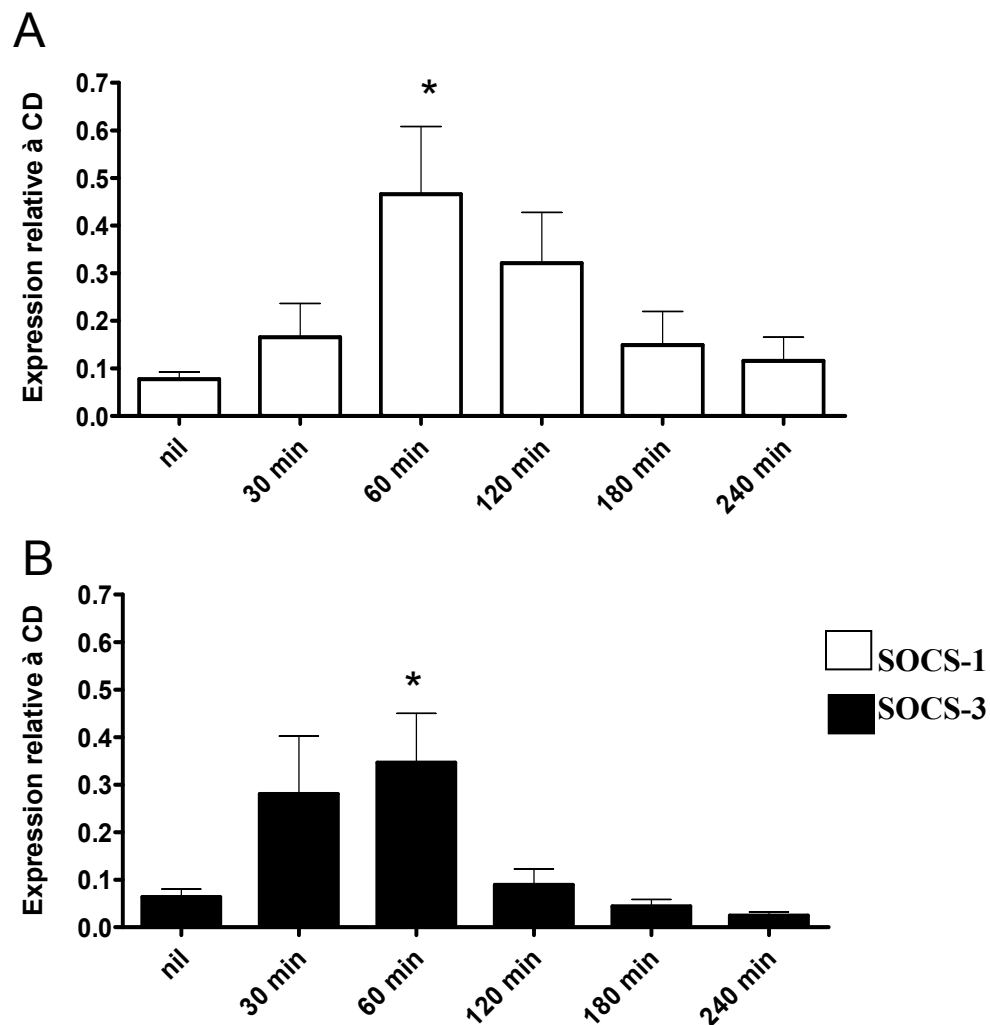


Figure 6 : Cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau de l'ARNm par les lymphocytes T CD8 suite à une stimulation avec l'IFN- β . Les lymphocytes T CD8 ont été mis en culture en présence d'IFN- β (1000 U/ml) pendant 30, 60, 120, 180 et 240 minutes comme indiqué sur l'abscisse. Les cellules ont été récoltées puis après l'extraction de l'ARN, l'expression des SOCS-1 (A) et SOCS-3 (B) a été analysée par PCR en temps réel. Les panneaux A et B représentent une compilation des résultats obtenus à partir d'au moins 5 donneurs sains, la moyenne \pm SEM est illustrée; * signifie $p < 0,05$, comparé à nil (cellules témoins non traitées à l'IFN- β).

d'expression maximaux des SOCS-1 (0,47 vs. 0,08) et SOCS-3 (0,34 vs. 0,06) atteignaient tous deux un taux quatre fois plus élevé que leur niveau basal. Ceci a permis de considérer dans les expériences ultérieures que le temps de stimulation optimal des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 était de 60 minutes.

Après avoir déterminé l'expression individuelle de chacune des molécules SOCS chez différents donneurs, il a été intéressant de comparer mutuellement la transcription en ARNm des SOCS-1 vs. SOCS-3 sous l'effet de l'IFN- β (Figures 8 A et 9 A, p.90, 91). Pour ce faire, nous avons calculé la différence entre le nombre de cycle moyens obtenus pour le gène cible et le contrôle 18S pour les cellules activées et les cellules témoins ($\Delta\Delta C_T$) selon la formule suivante :

$$\Delta\Delta C_T = [C_T(\text{SOCS}) - C_T(18S)]_{\text{témoin}} - [C_T(\text{SOCS}) - C_T(18S)]_{\text{activé}}$$

De cette façon, l'amplification de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a pu être comparée par rapport à l'ARN ribosomal 18S et non aux CD. Le contrôle interne (18S) est abondamment exprimé d'une manière équivalente dans toutes les cellules de mammifères. Ainsi, il était possible de comparer les $\Delta\Delta C_T$ de SOCS-1 vs. SOCS-3. L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été évaluée au niveau des cellules non stimulées en comparaison avec les cellules stimulées à l'IFN- β pendant 60 minutes, le pic d'expression. Pour le SOCS-1, nous remarquons que les échantillons obtenus des cellules T CD8 nécessitaient près de 14,52 cycles d'amplification pour sa détection, par contre après la stimulation optimale de 60 minutes, le nombre de cycle a diminué pour atteindre 12,0, alors une diminution de 2,52 cycles entre les cellules activées et les cellules témoins était à noter. Donc sous l'impact de l'IFN- β , l'ARNm codant pour SOCS-1 était en moyenne de 5,7 fois ($2^{2,52}$) plus abondant que le niveau de base, cette induction était statistiquement fiable (Figure 9 A). Quant au SOCS-3, au niveau des cellules non stimulées, 16,74 cycles ont été nécessaires pour sa détection. L'IFN- β a entraîné une diminution du nombre de cycles qui s'est établi à 14,18, donc on observait une diminution de 2,56 cycles entre les cellules activées et les cellules témoins. L'IFN- β a induit une augmentation d'environ 5,9 ($2^{2,56}$) fois de l'ARNm codant pour le SOCS-3 en comparaison au témoin non-stimulé (Figure 9 A). Ici aussi, l'augmentation du SOCS-3 était considérée valide au niveau statistique. Bien que le SOCS-1 avait un niveau basal d'expression plus élevé que le SOCS-3 dans les cellules T CD8,

nous avons remarqué que l'IFN- β avait un effet équivalent tant sur le SOCS-1 que sur le SOCS-3, puisque les augmentations déterminées en $\Delta\Delta C_T$ ont été conservées après la stimulation. Donc en résumé, dans les lymphocytes T CD8, sous l'influence de l'IFN- β , les ARNm codant pour les SOCS-1 et SOCS-3 étaient augmentés de façon équivalente par rapport à leur niveau basal d'expression.

Au niveau des lymphocytes T CD4 (Figure 7, p.88), encore une fois l'IFN- β a rapidement affecté les cellules et a induit après 30 minutes une augmentation notable des SOCS-1 et SOCS-3. Un plateau d'expression du SOCS-1 s'étendait de 30 minutes à 180 minutes. Une diminution a été notée à partir de 240 minutes tout en gardant un niveau plus élevé que le niveau basal. Quant au SOCS-3, il y a aussi eu un plateau mais ce dernier s'étendait entre 30 et 120 minutes. Le niveau de SOCS-3 a commencé à diminuer à partir de 180 minutes et est retourné au niveau initial après 240 minutes de stimulation ce qui n'était pas le cas pour le SOCS-1. Bien qu'il n'y ait pas de fiabilité statistique, nous avons considéré que le pic d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD4 incluait le temps de stimulation de 60 minutes pour les expériences ultérieures. Toutefois, nous avons remarqué la présence d'une tendance statistique en comparant les niveaux d'expression des SOCS-1 et de SOCS-3 dans les cellules non stimulées vs. 60 minutes ($p=0,0949$ nil vs. 60 min pour SOCS-1; et $p=0,0596$ nil vs. 60 min pour SOCS-3). L'expression du SOCS-1 a atteint un maximum de 0,3 d'expression relative en comparaison au CD, qui est trois fois plus élevé que le niveau basal observé chez les cellules non-stimulées (0,1). Les taux d'ARNm codant pour le SOCS-3 étaient deux fois plus élevés que le niveau initial. Toutefois ces valeurs ne peuvent être comparées en parallèle puisqu'elles sont analysées par rapport aux CD. Pour cela, il a été indispensable de calculer les $\Delta\Delta C_T$ de chaque molécule comme décrit à la section précédente.

La détection de l'ADNc du SOCS-1 dans les lymphocytes T CD4 par rapport au témoin 18S (Figures 8 B et 9 B) a requis 13,0 cycles d'amplification pour les cellules non stimulées, mais seulement 10,72 cycles pour les cellules stimulées à l'IFN- β se traduisant par un $\Delta\Delta C_T$ de SOCS-1 égal à 2,28. La validité statistique était encore une fois très forte à ce niveau.

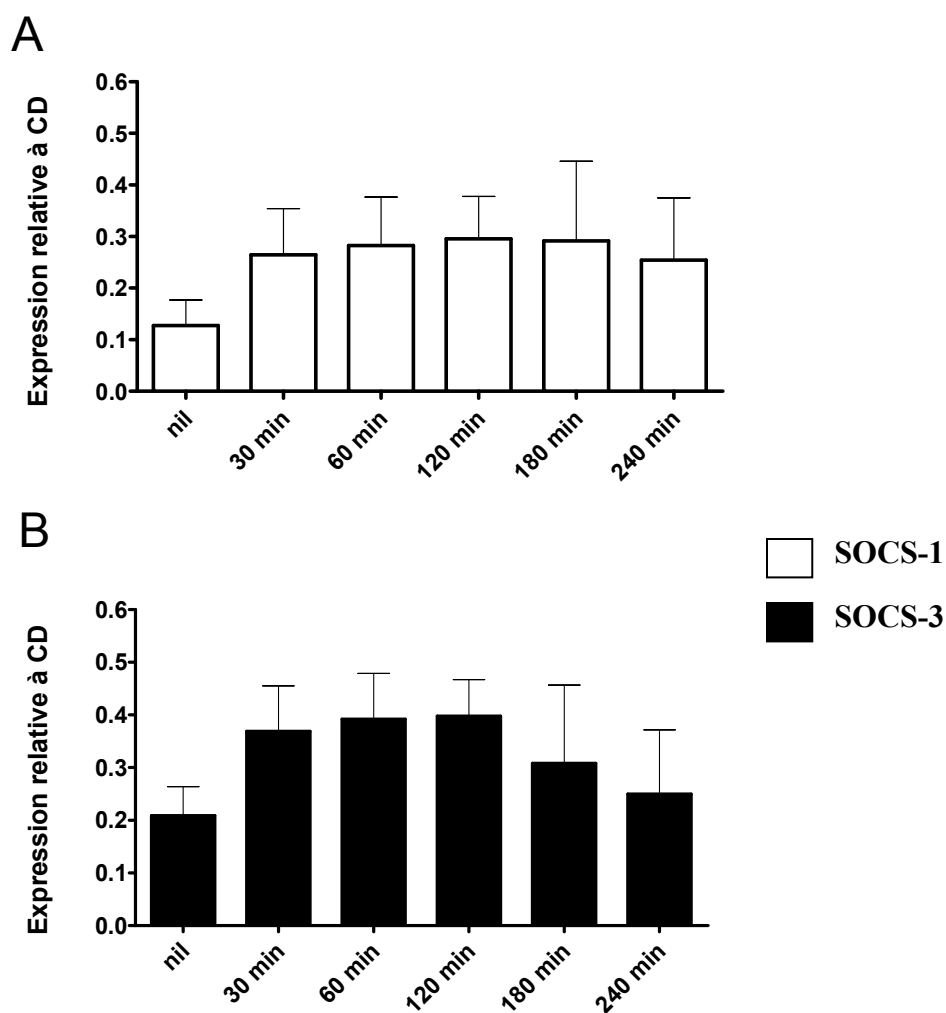


Figure 7 : Cinétique d'expression de SOCS-1 et SOCS-3 au niveau de l'ARNm par les cellules T CD4 suite à une stimulation à l'IFN- β

Les cellules T CD4 ont été mises en culture avec de l'IFN- β (1000 U/ml) pendant 30, 60, 120, 180 et 240 minutes comme indiqué sur l'abscisse. Les cellules ont été récoltées à chacune des durées mentionnées ci-dessus. L'ARN a été extrait puis l'expression des SOCS-1 (A) et SOCS-3 (B) a été analysée par PCR en temps réel. Les figures A et B représentent une compilation de résultats obtenus d'au moins 5 donneurs sains. Les cellules nil réfèrent au contrôle non traité à l'IFN- β .

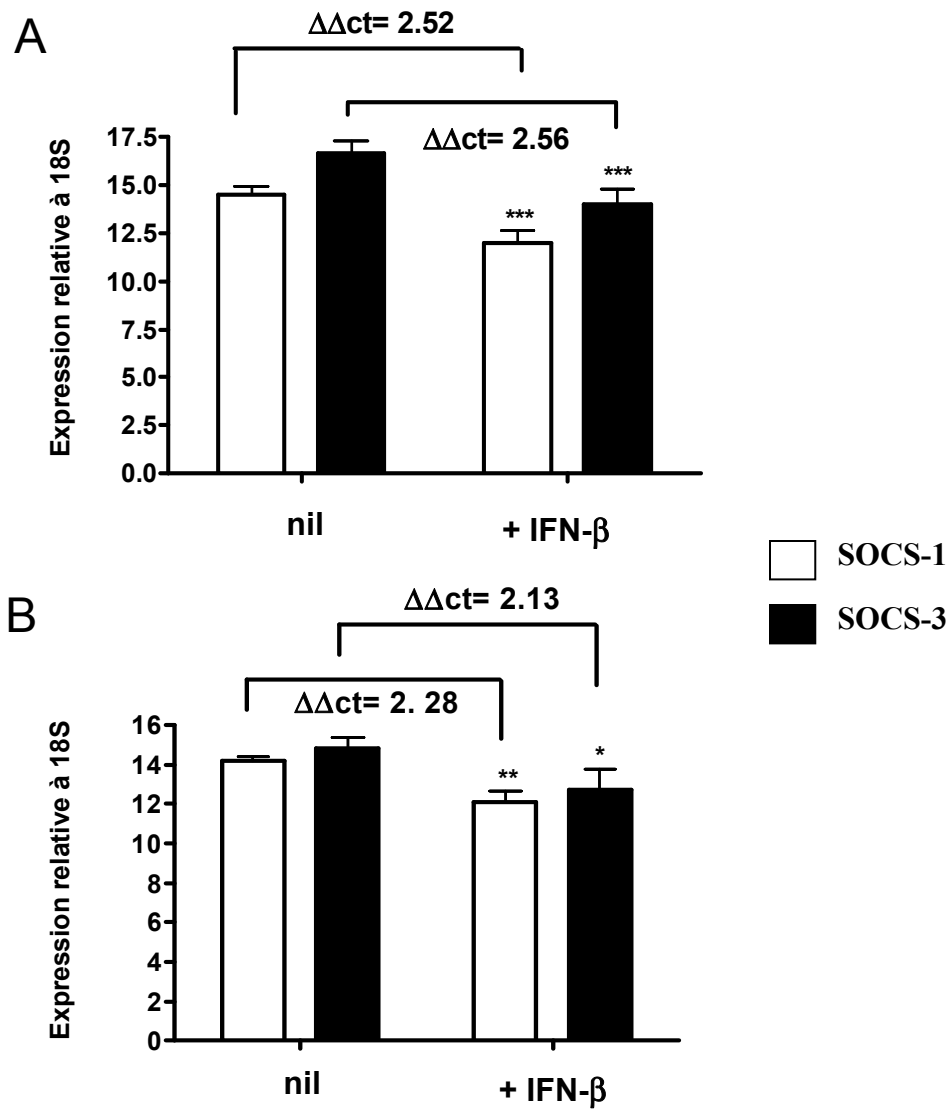


Figure 8: Comparaison des $\Delta\Delta ct$ des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 vs T CD4 en réponse à l'IFN- β

L'amplification de l'expression des SOCS-1 vs. SOCS-3 a été comparée par rapport à l'ARN ribosomal 18S. Ces résultats sont représentés sous forme de $\Delta\Delta ct$. Ces valeurs ont été calculées dans les cellules T CD8 (panneau A) et T CD4 (panneau B) sans traitement nil vs. stimulées avec l'IFN- β pour 60 minutes. * signifie $p < 0,05$, ** signifie $p < 0,01$ *** signifie $< 0,001$

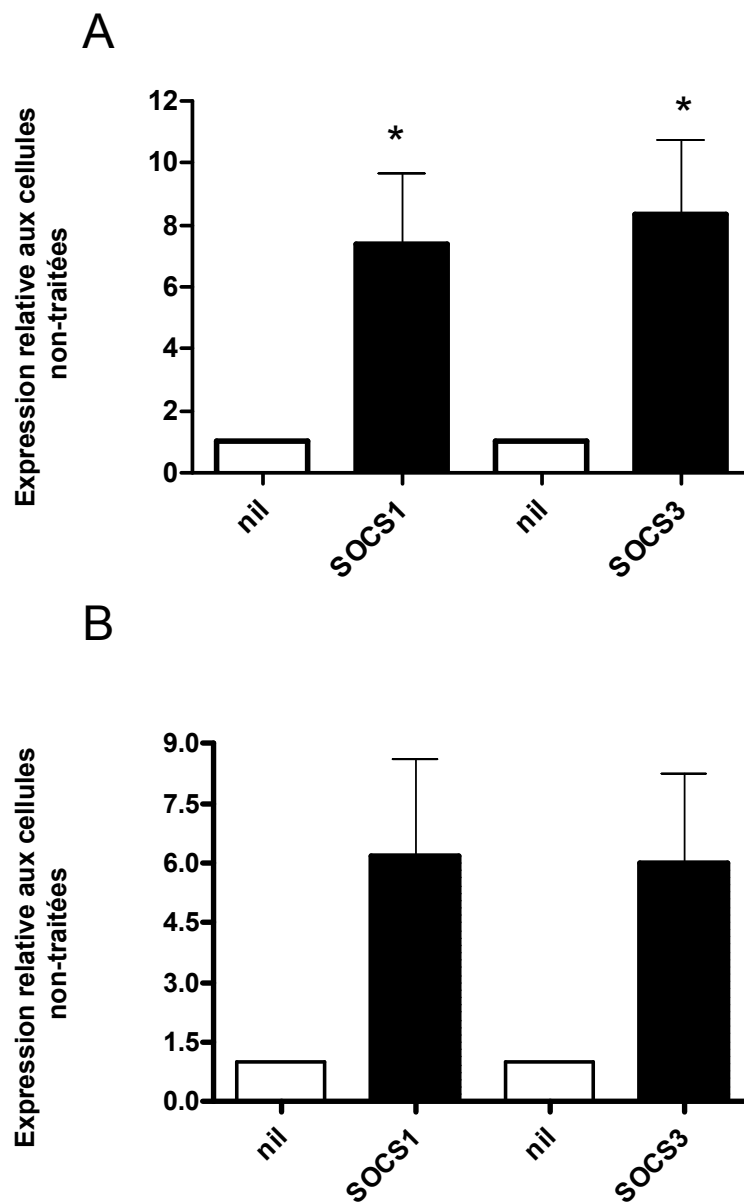


Figure 9 : Comparaison des $2^{\Delta\Delta ct}$ des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 et CD4 en réponse à l'IFN- β

L'amplification de l'expression des SOCS-1 vs. SOCS-3 a été comparée par rapport à l'ARN ribosomal 18S des cellules non traitées. Ces résultats ont d'abord été calculés en $\Delta\Delta ct$ puis représentés sous forme de puissance $2^{\Delta\Delta ct}$. Ces valeurs ont été calculées dans les cellules T CD8 (panneau A) et CD4 (panneau B) sans traitement nil (blanc) vs. stimulées avec l'IFN- β (noir) pour 60 minutes. * signifie $p < 0,05$.

L'ARNm de SOCS-3 dans les cellules non stimulées était moins exprimé et a requis 14,8 cycles d'amplification afin d'être détecté contre uniquement 12,17 cycles suite à la stimulation avec l'IFN- β . Le $\Delta\Delta CT$ du SOCS-3 était égal à 2,13. L'augmentation en ARNm du SOCS-3 était aussi significative. Donc, malgré que le SOCS-3 était moins exprimé au niveau basal dans les cellules T CD4 comparativement au SOCS-1, une stimulation avec l'IFN- β a induit une augmentation équivalente des SOCS-1 et SOCS-3. Et ce, en respectant un intervalle de près deux cycles de différence dans chacun des cas, que l'on peut estimer à une augmentation de 4 à 5 fois le nombre de copies d'ARNm ($2^{2,13}$ et $2^{2,28}$). Dans le but de simplifier la compréhension du changement d'expression des SOCS-1 et SOCS-3, nous avons présenté les graphes 9 A et B montrant les valeurs sous forme de puissances $2^{\Delta\Delta ct}$. De cette façon nous pourrions examiner et comparer le nombre de copies d'ARNm encodant les SOCS avant et après le traitement à l'IFN- β .

Une différence majeure était décelable entre nos deux sous-types cellulaires. En fait, en comparant les cycles d'amplification des SOCS-1 et de SOCS-3 dans les T CD8 et CD4 nous avons observé que les lymphocytes T CD8 exprimaient à la base moins des SOCS-1 et SOCS-3 que les lymphocytes T CD4. Ces derniers ont requis des cycles d'amplification de 13,0 pour le SOCS-1 et de 14,8 pour le SOCS-3. En opposition, dans les cellules T CD8, l'ARNm codant pour le SOCS-1 nécessitait 14,5 cycles d'amplification alors que le SOCS-3 a eu besoin de 16,7 cycles pour être détecté. Donc en moyenne, 1,7 cycles de PCR de plus ont été nécessaires pour amplifier les transcrits des SOCS-1 et SOCS-3 des cellules T CD8 non-stimulées ce qui suggèrent qu'elles avaient environ 3,24 ($2^{1,7}$) fois moins de copies d'ARNm (codant pour SOCS-1 et SOCS-3) que les cellules T CD4.

Finalement, bien que les SOCS-1 et SOCS-3 étaient exprimés à des niveaux basaux différents (SOCS-3 étant moins exprimé), ces derniers ont rapidement été induits par l'IFN- β et dans des proportions équivalentes au sein des lymphocytes T. De plus, les résultats suggèrent que les deux sous-types cellulaires T CD8 et CD4 répondaient avec la même intensité et efficacité à l'IFN- β .

1.1.2 Dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 et CD4.

Afin d'établir le lien entre le niveau d'induction des SOCS-1 et SOCS-3 et les différentes doses d'IFN- β , les lymphocytes T CD8 et CD4 ont été stimulés au temps optimal (60 minutes) avec quatre différentes concentrations soit; 10, 100, 1 000 et 10 000 U/ml. Le taux d'expression en ARNm des SOCS-1 et SOCS-3 a été évalué par qRT-PCR. Encore une fois, les niveaux des SOCS dans les lymphocytes T ont été standardisés par rapport à l'ARN ribosomal 18S puis comparés par rapport au témoin positif soit les cellules dendritiques. Au niveau des lymphocytes T CD8 (Figure 10), l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 a augmenté parallèlement à la dose d'IFN- β administrée. Toutefois, la courbe dose-réponse du SOCS-3 a atteint un seuil à partir de 1 000 U/ml d'IFN- β . Au-delà de cette valeur, l'IFN- β semblait ne plus avoir d'effet additionnel quant l'induction du SOCS-3. Le pic d'expression du SOCS-1 était à 10 000 U/ml alors que le pic du SOCS-3 à 1 000 U/ml. Par rapport aux CD, l'expression maximale des SOCS-1 et SOCS-3 a atteint une valeur proche de 0,6. Ainsi, aux pics d'expressions, les taux d'ARNm codant pour les SOCS-1 et SOCS-3 ont dépassé par six fois les niveaux basaux (0,1). Un autre point à considérer est que la dose minimale nécessaire pour déclencher l'augmentation des SOCS-1 et de SOCS-3 dans les deux cas se situait à 100 U/ml d'IFN- β . Les résultats obtenus pour la courbe dose-réponse au niveau des cellules T CD8 montraient une similarité entre les profils d'expression des SOCS-1 et SOCS-3. Bien qu'il n'y ait pas de fiabilité statistique au niveau de l'échantillonnage, il existait une certaine tendance entre les valeurs obtenues au niveau des cellules non stimulées vs. au pic d'expression ($p= 0,09$ nil vs. 10 000 U/ml pour le SOCS-1; et $p= 0,07$ nil vs. 1 000 U/ml pour le SOCS-3). Ce qui nous laisse croire qu'en compilant davantage de donneurs sains, ceci permettrait d'atteindre une meilleure fiabilité statistique.

La courbe dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 obtenue pour les lymphocytes T CD4 avait une allure différente des cellules T CD8 et reproduisait une courbe de forme gaussienne (Figure 11). Encore une fois, nous remarquons que les ARNm codants pour les SOCS-1 et SOCS-3 commençaient à être augmentés à partir de 100 U/ml d'IFN- β . Leur expression a continué d'accroître de manière proportionnelle avec la concentration de cytokine ajoutée jusqu'à la dose de 1 000 U/ml. En fait, les niveaux

d'expression des SOCS avaient rechuté à 10 000 U/ml, tout en restant supérieurs aux valeurs basales. Par ailleurs, les résultats obtenus à 1 000 et à 10 000 U/ml montraient un degré de validité notable quant à l'expression des SOCS-1 et de SOCS-3 en comparaison aux cellules non activées. En fait, il existait une probabilité de 5% ou moins pour que la relation entre les variables trouvées dans nos échantillons soit une coïncidence. Ceci vient confirmer qu'à des doses supérieures d'IFN- β (10 000 U/ml), les cellules T CD4 diminuaient leur expression des SOCS-1 et SOCS-3 et n'étaient plus réceptives contrairement aux cellules T CD8.

En se basant sur les résultats obtenus, nous remarquons que les deux sous-types cellulaires T CD8 et CD4 répondaient différemment aux hautes doses d'IFN- β . Les cellules T CD8 augmentaient leur taux des SOCS-1 et SOCS-3 proportionnellement à la dose de cytokine additionnée. Alors que, les cellules T CD4 atteignaient leur seuil de stimulation à 1000 U/ml.

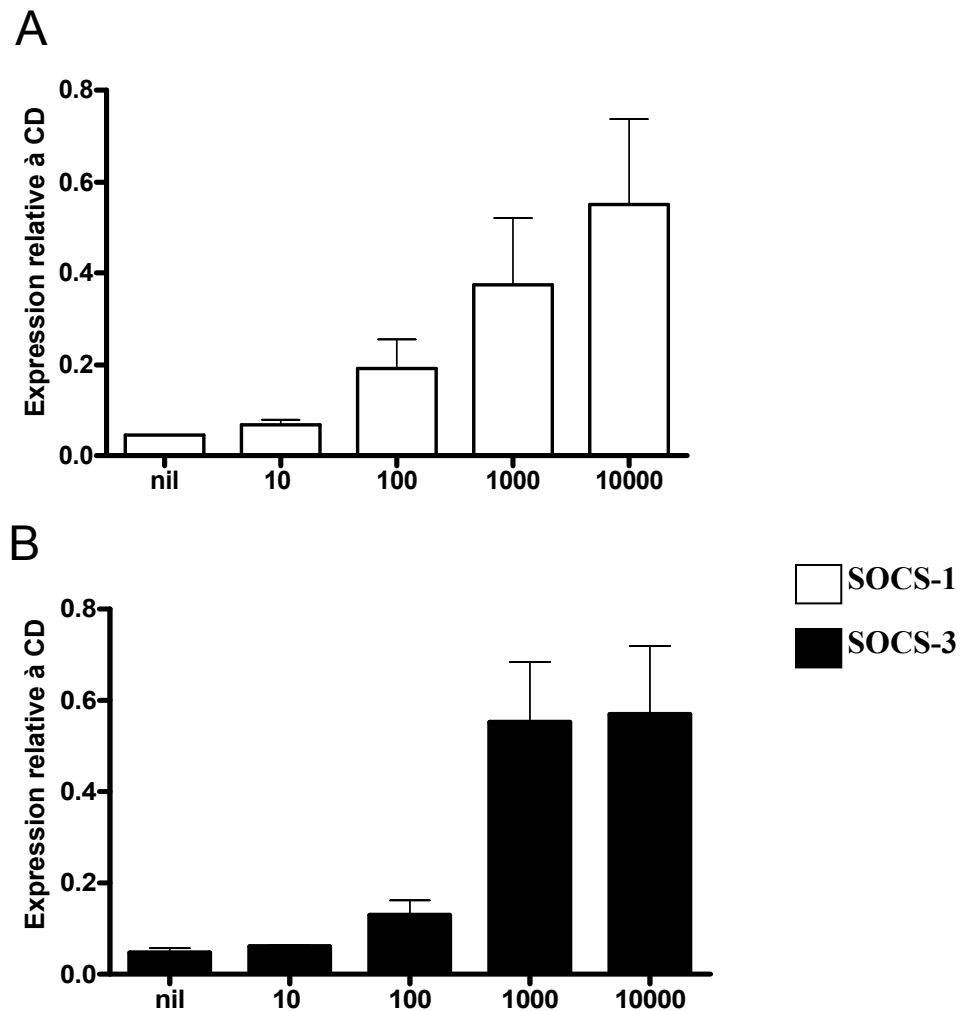


Figure 10 : Dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau des cellules T CD8 en réponse à l'IFN- β

Les cellules T CD8 ont été incubées avec quatre concentrations différentes d'IFN- β soit: 10, 100, 1000 et 10000 U/ml et ce, pendant 1 heure à 37°C, comme indiqué sur l'abscisse. Après la stimulation, les cellules ont été récoltées afin d'extraire l'ARN. L'expression des SOCS-1 (A) et SOCS-3 (B) a été analysée par PCR en temps réel. Les figures A et B représentent une compilation de résultats obtenus à partir de 3 donneurs sains. Les cellules nil réfèrent au contrôle. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM.

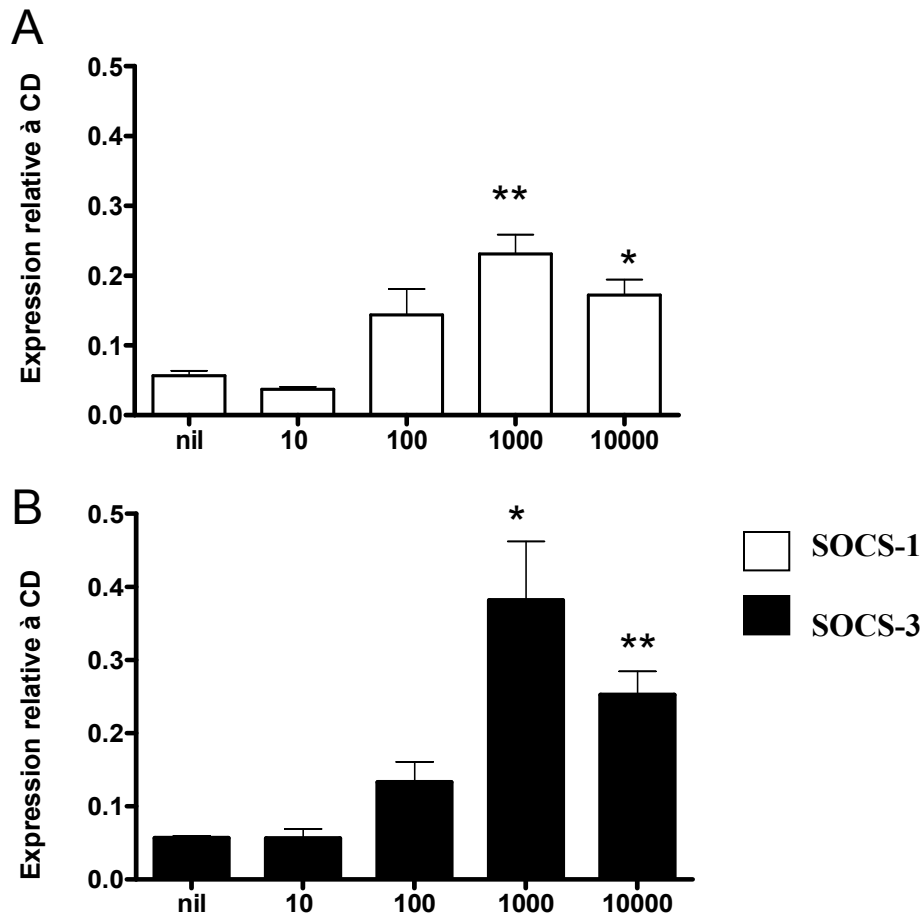


Figure 11 : Dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau des cellules T CD4 stimulées avec l'IFN- β

Les cellules T CD4 ont été incubées avec quatre concentrations différentes d'IFN- β soit: 10, 100, 1000 et 10000 U/ml pendant 1 heure de temps à 37°C, comme indiqué sur l'abscisse. Après la stimulation, les cellules ont été récoltées afin d'extraire l'ARN. L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été analysée par PCR en temps réel. Les figures A et B représentent une compilation de résultats obtenus à partir de 4 donneurs sains. Les cellules nil réfèrent au contrôle. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM; * signifie $p < 0,05$, ** signifie $p < 0,01$ comparé à nil.

1.2 L'exposition chronique à l'IFN- β induit uniquement le SOCS-1 de façon répétée

Dans le but d'étudier les effets d'une exposition chronique à l'IFN- β sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3, les lymphocytes T CD8 et CD4 ont été purifiés et stimulés d'une façon répétée; de sorte que les cellules recevaient une nouvelle dose d'IFN- β (100 U/ml) à chaque 48 heures, et ce pendant 60 minutes de stimulation (pic d'ARNm-section 1.1.1, p.84) avant leur récolte pour l'extraction d'ARNm. L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été évaluée au niveau de l'ARNm par qRT-PCR. Les niveaux d'expression ont aussi été comparés à notre gabarit, les CD.

Pour les lymphocytes T CD8 (Figure 12), une différence très notable était observée en comparant les portraits d'expression en ARNm des SOCS-1 et SOCS-3. Après chaque ajout d'IFN- β , les niveaux en ARNm du SOCS-1 ont augmenté. Plus précisément, les cellules non stimulées présentaient déjà un niveau basal de SOCS-1, sauf qu'après 60 minutes de stimulation (temps optimal), l'IFN- β induisait près de cinq fois plus de SOCS-1 (0,2 vs 0,04). Cette induction a déjà été démontrée au cours de la cinétique (Figure 6). Après 48 heures de stimulation sans aucun ajout additionnel d'IFN- β , les niveaux de SOCS-1 ont rechuté pour atteindre des valeurs minimales voire nulles (0,007) et inférieures aux niveaux basaux des cellules non stimulées. D'autre part, en administrant une deuxième dose d'IFN- β après 48 heures et ce pendant 1 heure de temps, les niveaux d'ARNm du SOCS-1 ont augmenté à nouveau d'une façon notable pour atteindre une valeur de 0,07. Ceci représente une augmentation de dix fois le nombre de copies codant pour le SOCS-1. Les cellules ayant reçu uniquement deux doses d'IFN- β et incubées pendant 96 heures montraient des niveaux de SOCS-1 pratiquement nuls (0,007). De façon opposée, les cellules recevant la troisième dose d'IFN- β après 96 heures, pendant 60 minutes d'incubation, ont subi encore une fois une hausse significative de l'ARNm codant pour le SOCS-1 pour parvenir à une valeur moyenne de 0,04. Donc à la troisième dose, il y a six fois plus de copies d'ARNm codant pour le SOCS-1 dans les cellules activées pour une troisième fois avec l'IFN- β que les cellules n'ayant reçu que deux doses d'IFN- β pendant 96 heures. De façon très intéressante, après chaque ajout additionnel d'une dose égale d'IFN- β , l'accroissement du niveau en ARNm de SOCS-1 était statistiquement valable par rapport à l'échantillon correspondant n'ayant pas reçu une nouvelle dose.

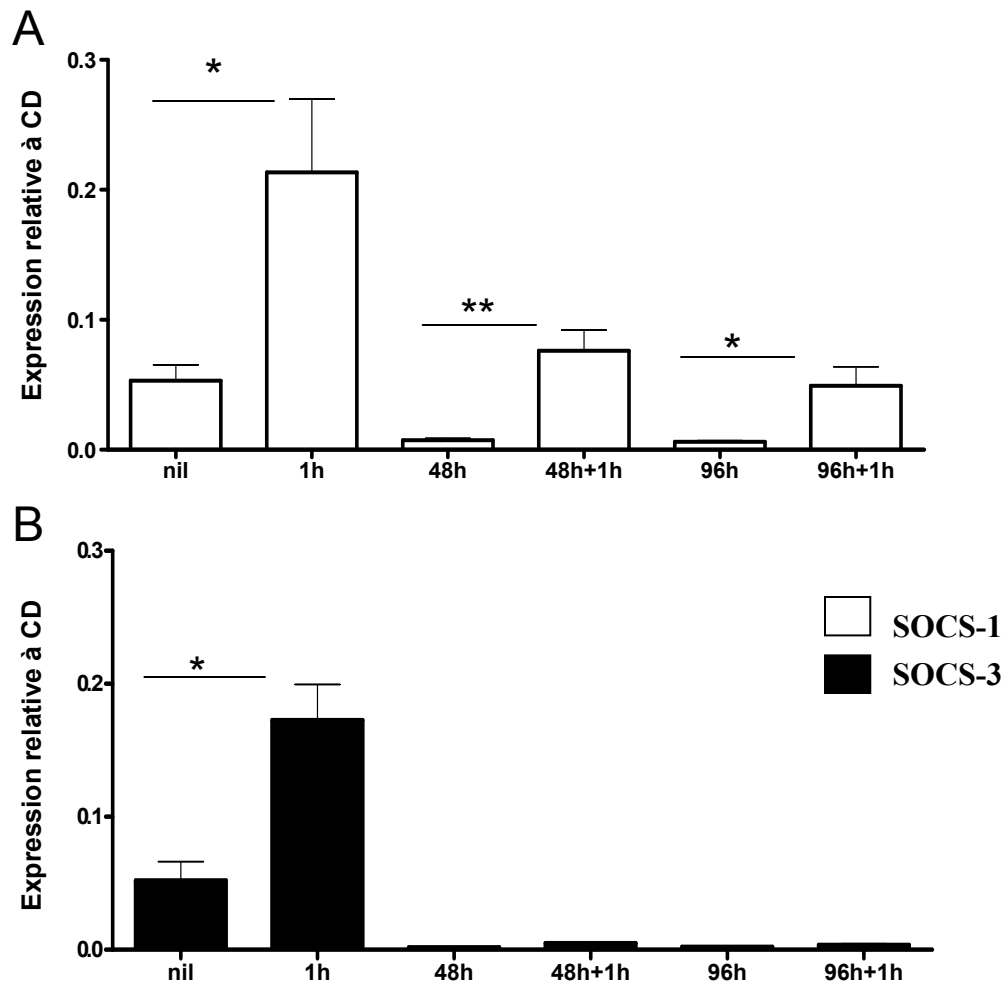


Figure 12: Réponses des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 suite à une exposition répétée à l'IFN- β

Les cellules T CD8 ont été mises en culture avec de l'IFN- β (100 U/ml) pendant 1 heure et ce, à chaque 48 heures comme indiqué sur l'abscisse. Les cellules ont été récoltées à chacun de ces intervalles. Suite à l'extraction de l'ARN, l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été analysée par PCR en temps réel. Les figures A et B représentent une compilation des résultats obtenus à partir de 6 donneurs sains. Les cellules nil réfèrent au contrôle. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM; * signifie $p < 0,05$, ** signifie $p < 0,01$ comparé à l'échantillon homologue non stimulé (nil et 1h, 48h et 48h+1h, 96h et 96h+1h)

Cette augmentation chronique du SOCS-1 suite à une courte stimulation avec l'IFN- β se manifestait de façon équivalente au niveau de tous nos différents échantillons.

L'exposition chronique des lymphocytes T CD8 à l'IFN- β a montré un profil d'expression de SOCS-3 totalement différent de celui du SOCS-1. L'IFN- β affectait très rapidement les cellules en induisant considérablement l'expression du SOCS-3 lors de la première exposition, pareillement au SOCS-1. Le degré d'expression du SOCS-3 a accédé à une valeur moyenne de 0,3 vs. 0,07 chez les cellules non stimulées. Ceci implique qu'il y a eu quatre fois plus de copies d'ARNm après la première dose d'IFN- β , de façon similaire à ce que nous avons observé pour le SOCS-1. Toutefois, une pareille réponse n'a pas été visualisée lors des ajouts subséquents d'IFN- β . Les expositions répétées à l'IFN- β n'ont pas induit une nouvelle production d'ARNm codant pour le SOCS-3. Les niveaux de la présente molécule exprimés chez les cellules stimulées chroniquement vs. les cellules sans dose additionnelle étaient très similaires et quasi-nuls (0,004 maximum). De plus, le taux de SOCS-3 chez ces cellules était inférieur par comparaison avec le niveau basal (0,07, vs. 0,004).

L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 par les lymphocytes T CD4 suite au contact répété avec l'IFN- β (Figure 13) ressemblait au profil général obtenu au niveau des lymphocytes T CD8. Tous deux, les SOCS-1 et SOCS-3 ont été induits après 60 minutes de stimulation avec l'IFN- β . Tout comme dans les lymphocytes T CD8, l'augmentation répétée de SOCS-1 a été conservée et synchronisée avec les ajouts de doses additionnelles d'IFN- β . Après la première dose, l'échelon d'expression de SOCS-1 a atteint une valeur moyenne de 0,33 en comparaison avec un taux de 0,08 pour les cellules non traitées, ce qui démontre un accroissement de quatre fois plus de copies d'ARNm codant pour le SOCS-1. A la deuxième et troisième doses, les réponses des cellules T CD4 quant à la recrudescence du SOCS-1 étaient très similaires par rapport à la première stimulation avec l'IFN- β . Ce qui n'était pas le cas pour le SOCS-3, les cellules sont devenues réfractaires à des stimulations subséquentes d'IFN- β . Ainsi, tout comme au niveau des cellules T CD8, le taux de SOCS-3 était inchangé et indifférent (proche de 0,07) aux ajouts répétés d'IFN- β . Toutefois, malgré la grande similarité d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 vs. CD4 en réponse à l'IFN- β chronique, certaines différences peuvent être remarquées.

En comparant aux CD, les lymphocytes T CD8 répondaient un peu plus efficacement à l'IFN- β chronique surtout à la deuxième et troisième doses, et ce en induisant de six à dix fois plus de SOCS-1 que les cellules n'ayant pas reçues les doses additionnelles. Tandis qu'au niveau des lymphocytes T CD4, les copies d'ARNm encodant SOCS-1 ont été augmentées de quatre fois en moyenne aux trois ajouts d'IFN- β et ce, en comparaison avec les cellules sans dose supplémentaire. Un autre point à considérer est que les niveaux de rechute de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD4 (48 heures après chaque ajout), conservaient un certain niveau basal des SOCS détectables tandis que les cellules T CD8 exprimaient des niveaux inférieurs à ceux des cellules non-stimulées (niveau de base initial). Conséquemment, ces résultats suggèrent que seul le SOCS-1 serait induit chroniquement sous les effets répétés d'IFN- β .

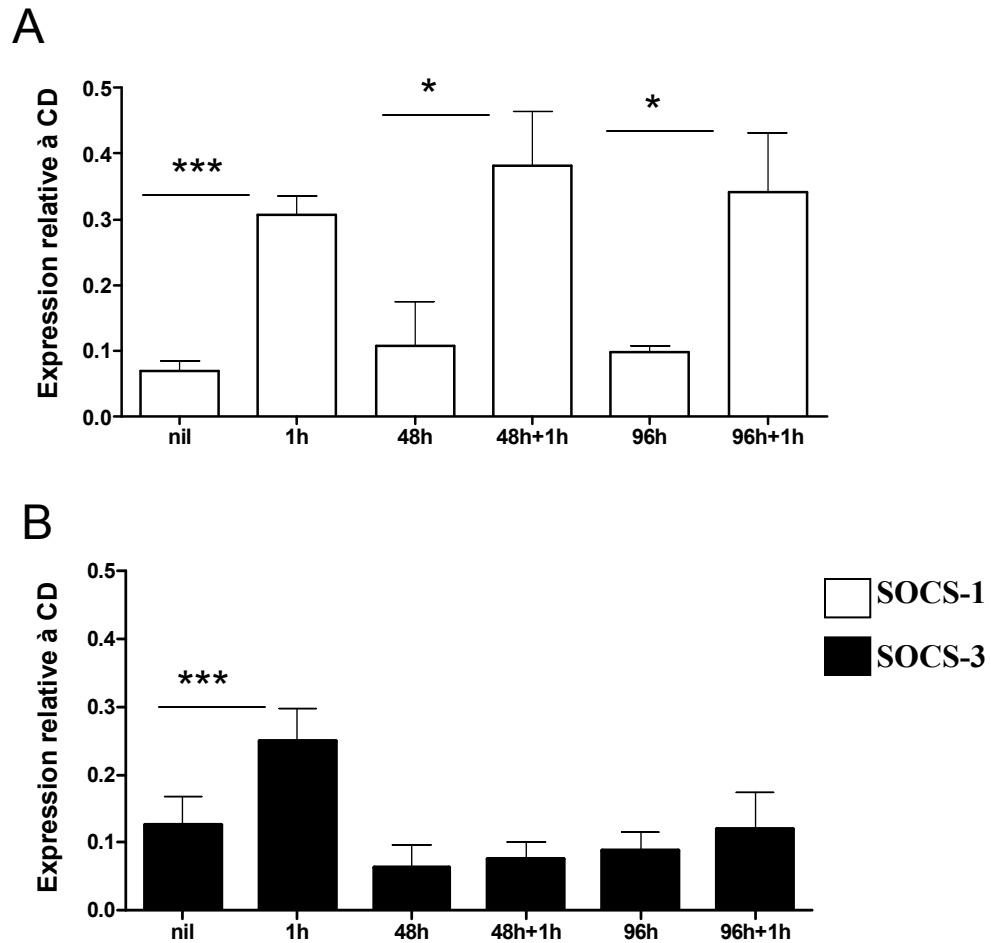


Figure 13 : Réponses des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD4 suite à une exposition répétée à l'IFN- β

Les cellules T CD4 ont été mises en culture avec l'IFN- β (100 U/ml) pendant 1 heure, à chaque 48 heures comme indiqué sur l'abscisse. Les cellules ont été récoltées à chacun de ces intervalles. Suite à l'extraction de l'ARN, l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été analysée par PCR en temps réel. Les figures A et B représentent une compilation de résultats obtenus à partir de 6 donneurs sains. Les cellules nil réfèrent au contrôle. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM; * signifie $p < 0,05$, *** signifie $p < 0,001$ comparé à l'échantillon homologue non stimulé (nil et 1h, 48h et 48h+1h, 96h et 96h+1h)

2.0 Effets de l'IL-27 sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3

2.1 L'IL-27 induit rapidement l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T humains.

2.1.1 Cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à l'IL-27 dans les lymphocytes T CD8 et CD4.

Dans le but d'examiner l'expression en ARNm des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 et CD4 en réponse à l'IL-27, nous avons purifié les deux sous-types cellulaires à partir des PBMC de donneurs sains tel que décrit précédemment. Les lymphocytes T ont été stimulés avec de l'IL-27 (100 ng/ml) pendant une heure ou trois heures de temps avant la récolte des cellules pour extraction d'ARN. L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été évaluée au niveau de l'ARNm par PCR en temps réel. Les résultats obtenus ont été standardisés par rapport à l'ARN ribosomal 18S, puis comparés aux taux des SOCS obtenus au niveau du témoin positif soit les cellules dendritiques (CD).

Autant chez les lymphocytes T CD8 que chez les CD4 (Figures 14 A et B), nous avons observé un profil d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 assez comparable. Dans les deux sous-types cellulaires, le pic d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 était après 60 minutes de stimulation. La rechute du taux d'ARNm était visible après 180 minutes de stimulation à l'IL-27. Toutefois, les niveaux des SOCS-1 et SOCS-3 restaient un peu plus élevés que le niveau basal. Une stimulation plus prolongée serait peut-être nécessaire pour observer le retour au niveau initial dans les deux sous-types lymphocytaires. En comparant la cinétique de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à l'IFN- β vs. l'IL-27, dans les deux cas nous avons remarqué que le temps optimal de stimulation était à 60 minutes. Toutefois, nous remarquons des différences entre les lymphocytes T CD8 stimulés avec l'IFN- β vs. l'IL-27, quant au niveau d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 après trois heures de stimulation. En fait, il semble que les cellules T CD8 stimulées à l'IL-27 conservaient un certain degré d'expression des deux molécules SOCS qui était supérieur au taux basal. Ce qui n'est pas le cas dans les cellules T CD8 stimulées à l'IFN- β , après trois heures de stimulation ces dernières avaient un niveau d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 très proche à celui des cellules non traitées. Par contre, après trois heures de traitement avec

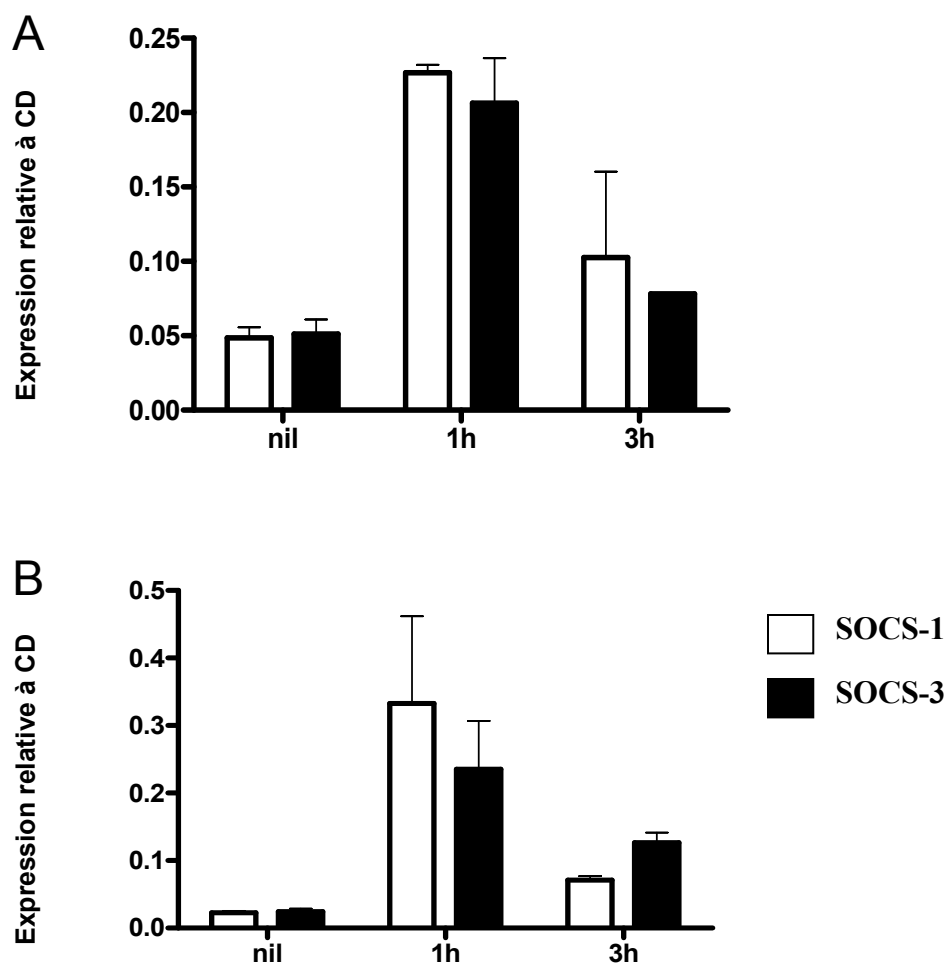


Figure 14: Cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 et CD4 en réponse à l'IL-27

Les cellules T CD8 (figure A) et les CD4 (figure B) ont été mises en culture avec l'IL-27 (100 ng/ml) pendant une ou trois heures à 37°C avant d'être récoltées pour l'extraction de l'ARN. L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été analysée par PCR en temps réel. Les figures A et B représentent une compilation de résultats obtenus à partir de 2 donneurs sains. Les cellules nil réfèrent au contrôle.

l'une ou l'autre des cytokines, les lymphocytes T CD4 semblaient maintenir une expression des SOCS-1 et SOCS-3 plus élevée que le niveau basal. Ces résultats suggèrent que l'IL-27 avait un effet un peu plus durable sur les lymphocytes T CD8 en comparaison avec l'IFN- β .

2.2 IL-27 induit les SOCS-1 et SOCS-3 préférentiellement dans les cellules T CD8.

2.2.1 Dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 et CD4.

Afin d'étudier le niveau d'induction des SOCS-1 et SOCS-3 en fonction des différentes doses d'IL-27, les lymphocytes T CD8 et CD4 ont été stimulés au temps optimal (60 minutes) avec trois différentes concentrations; soit 10, 100 et 250 ng/ml. Les taux d'expression en ARNm des SOCS-1 et SOCS-3 ont été évalués par qRT-PCR et standardisés par rapport à l'ARN ribosomal 18S puis comparés aux cellules dendritiques, notre gabarit.

Tout d'abord, nous avons étudié l'expression différentielle du SOCS-1 en parallèle dans nos deux sous-types cellulaires (Figure 15 A). Dans les lymphocytes T CD8, l'augmentation de l'expression du SOCS-1 en réponse à l'IL-27 était induite à partir de la dose de 100 ng/ml, il semble que des faibles quantités de la présente cytokine soit 10 ng/ml n'avaient point d'effet sur les cellules T CD8. En fait, le niveau d'expression de SOCS-1 à cette concentration était inchangé par rapport au taux d'ARNm dans les cellules non stimulées (0,15). Après une stimulation avec 100 ng/ml, les lymphocytes T CD8 étaient très réceptifs à l'IL-27, de sorte qu'ils ont haussé la synthèse de l'ARNm codant pour le SOCS-1 en atteignant une valeur moyenne de 0,76. Ceci montre que le traitement avec 100 ng/ml d'IL-27 a entraîné une accumulation d'environ cinq fois plus de copies d'ARNm encodant le SOCS-1, en comparaison avec les cellules non-traitées ou ayant reçu la faible dose de 10 ng/ml. Bien qu'à 100 ng/ml l'accroissement du taux de SOCS-1 n'était pas statistiquement prouvé, il existait une certaine tendance à prendre en considération au niveau des valeurs obtenues entre les différents donneurs ($p=0,08$). Donc en compilant des résultats provenant de davantage de donneurs on pourrait avoir une meilleure fiabilité. Quant à l'expression du SOCS-1 dans les cellules T CD4, nous avons remarqué que ces dernières répondaient moins efficacement à l'IL-27. Nous n'avons pas détecté une augmentation de SOCS-1 à 100 ng/ml contrairement aux cellules T CD8. Toutefois, une hausse d'expression était

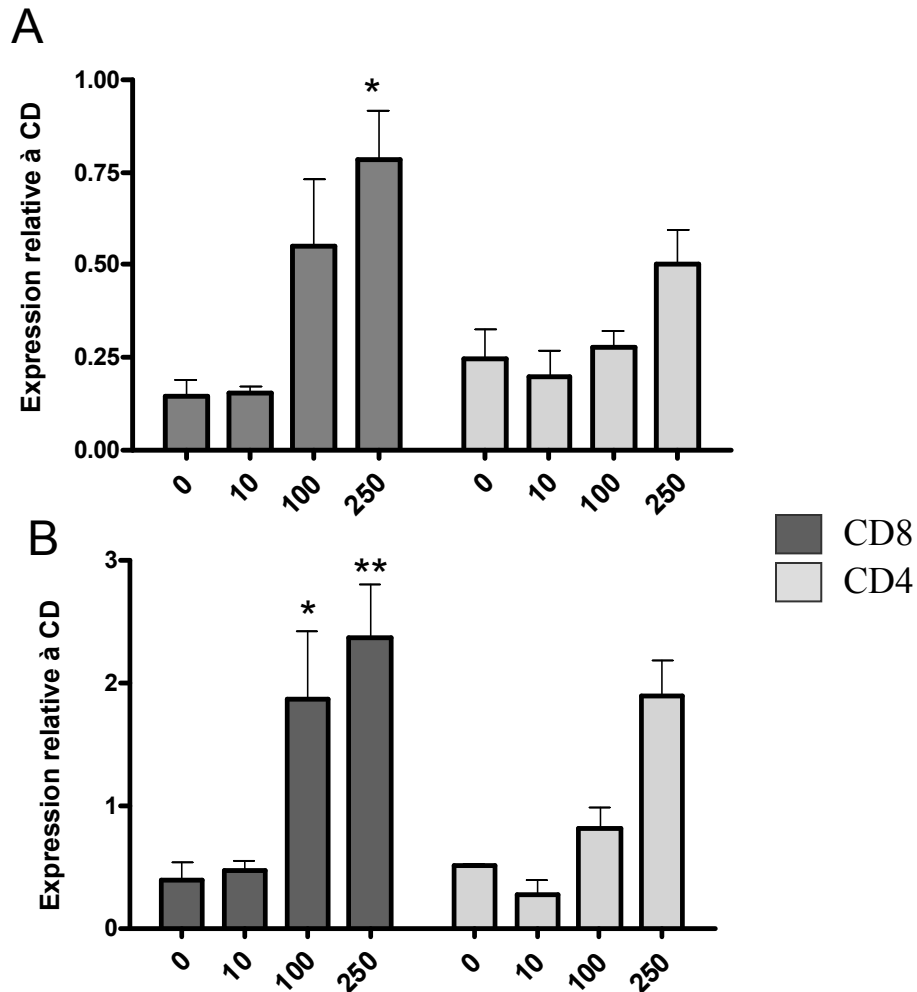


Figure 15 : Dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 et CD4 en réponse à l'IL-27.

Les cellules T CD8 et CD4 ont été mises en culture avec trois concentrations d'IL-27: 10, 100 et 250 ng/ml, pendant 1 heure à 37°C comme indiqué sur l'abscisse. Les cellules ont été récoltées à chacun de ces intervalles. Suite à l'extraction de l'ARN, l'expression des SOCS-1 (figure A) et SOCS-3 (figure B) a été analysée par PCR en temps réel. Ces deux figures représentent une compilation de résultats obtenus à partir de 4 donneurs sains. Les cellules nil réfèrent au contrôle. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM; * signifie $p < 0,05$, **signifie $p < 0,01$ comparé à nil.

observée à 250 ng/ml (0,5) conduisant à deux fois plus d'ARNm de SOCS-1 que les cellules T CD4 non stimulées (0,25). Or, l'augmentation de l'expression de SOCS-1 dans les T CD8 restait plus prononcée que dans les cellules T CD4.

Quant à l'expression du SOCS-3, nous avons noté un patron similaire à celui du SOCS-1 (Figure 15 B). Dans les cellules T CD8, le taux en ARNm de SOCS-3 était augmenté proportionnellement à la dose d'IL-27 ajoutée, mais ce à partir de 100 ng/ml, puisqu'une stimulation avec 10 ng/ml n'avait pas d'impact. Donc à cette première dose efficace, le taux d'ARNm codant pour SOCS-3 avait égalé une valeur de 2,0; par contre les cellules non stimulées avaient un niveau assez faible d'ARNm atteignant un taux proche de 0,5. Ce qui fait que le traitement des cellules T CD8 avec 100 ng/ml d'IL-27 a majoré la quantité d'ARNm codant pour SOCS-3 de quatre fois. De plus, cette augmentation avait une validité statistique prouvant que les cellules de différents donneurs répondaient de manière concordante. Lorsque ces cellules avaient été traitées avec la dose la plus élevée soit 250 ng/ml, les niveaux d'ARNm de SOCS-3 ont augmenté davantage pour parvenir à une valeur proche de 2,5. Ainsi, il y a eu une accumulation d'ARNm codant pour le SOCS-3 cinq fois plus considérable par rapport aux cellules non-traitées. Ici aussi, une fiabilité mathématique existait entre les échantillons traités et non-traités. L'effet de l'IL-27 sur l'expression de SOCS-3 dans les lymphocytes T CD4 montrait une similarité à l'expression de SOCS-1 dans ces mêmes cellules. En fait, à 100 ng/ml une légère induction de SOCS-3 était observable et atteignait une valeur de 0,70 vs. 0,50 pour les cellules non traitées, toutefois cette hausse n'avait pas un caractère significatif et pouvait être causée par les marges d'erreurs formées par la variabilité des réponses entre les différents donneurs. A la dose de 250 ng/ml d'IL-27, nous avons détecté une augmentation plus notable de SOCS-3 (2,0) en comparaison avec la dose précédente. Sans toutefois atteindre une fiabilité statistique, cette dernière dose a entraîné des niveaux de SOCS-3 quatre fois plus élevés par rapport aux cellules non traitées. Dans les lymphocytes T CD4, une stimulation avec 250 ng/ml induisait un taux d'ARNm codant pour le SOCS-3 équivalent à un traitement avec 100 ng/ml dans les lymphocytes T CD8. En se basant sur les résultats de la courbe dose-réponse à l'IL-27, nous concluons que les lymphocytes T CD8 répondaient plus efficacement en déclenchant l'induction des SOCS-1 et de SOCS-3 à partir de 100 ng/ml d'IL-27. Alors que pour les lymphocytes T CD4, des doses plus importantes d'IL-27 étaient nécessaires pour permettre une augmentation décelable de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3.

2.3 Comparaison de l'effet de l'IL-27 sur l'expression des SOCS par les cellules T

Nous avons pu comparer simultanément l'expression d'une même molécule dans les lymphocytes T CD8 et dans les CD4 et ce par rapport au CD. Mais dans le but de comparer l'effet de l'IL-27 sur les SOCS-1 et SOCS-3, nous avons calculé les $\Delta\Delta C_T$ de chacune de ces molécules au niveau des cellules non traitées et de celles qui ont été stimulées avec 250 ng/ml d'IL-27 ce qui est le plus significatif. Nous avons utilisé la même formule employée pour étudier l'effet de l'IFN- β (section 1.1.1, p.84). Rappelons que ce calcul est nécessaire pour comparer les deux molécules SOCS côte à côte par rapport au gène contrôle 18S et non au gabarit de CD, puisqu'elles ont des niveaux basaux différents.

Pour le SOCS-1, les cellules T CD8 non stimulées avaient besoin en moyenne de 12,3 cycles d'amplification supplémentaires par rapport au 18S, par contre ces cellules traitées avec l'IL-27 avaient uniquement recours à 9,95 cycles d'amplification, donc un $\Delta\Delta C_T = 2,35$ a été obtenu, une différence montrant une validité statistique (Figure 16 A). Nous remarquons une augmentation moyenne du nombre de copies d'ARNm de 5 fois ($2^{2,35}$) dans les lymphocytes T CD8 traités. Ces résultats ont été présentés aussi sous forme de puissance ($2^{\Delta\Delta C_T}$) pour montrer l'augmentation en ARNm par rapport aux cellules non traitées (Figure 17 A). Ici aussi il y avait une fiabilité statistique, ce qui vient prouver davantage nos résultats. Quant à l'expression de SOCS-3, nous remarquons une augmentation moyenne proche de six fois le nombre de copies d'ARNm, ce qui est très similaire au SOCS-1. Les échantillons de cellules T CD8 non traitées avaient nécessité 14,0 cycles de plus que le 18S pour être détectée. Alors que le nombre de cycle chutait notablement jusqu'à 11,2 cycles pour visualiser le SOCS-3 dans les cellules stimulées avec 250 ng/ml d'IL-27. Ce qui aboutit à un $\Delta\Delta C_T = 2,8$ semblable à celui de SOCS-1 (Figure 16 A). Ceci suggère que l'IL-27 agissait avec la même efficacité sur les SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8. A la figure 17 A, nous observons une représentation inversée de la figure 16 A, indiquant une augmentation significative de SOCS-3 dans les cellules stimulées.

Au niveau des cellules T CD4 (Figure 16 B) une large différence est à notée en comparaison avec les cellules T CD8; le nombre de copies codant pour SOCS-1 a été

augmenté uniquement de deux fois dans les cellules traitées à l'IL-27 vs. celles sans traitement. Ces dernières nécessitaient 12,2 cycles de plus que le gène 18S pour la détection de SOCS-1 en ARNm, alors que les échantillons de cellules T CD4 stimulées avec l'IL-27 avaient besoin de 11,27 cycles. Ceci se traduisait par un $\Delta\Delta C_T = 0,93$. Le $\Delta\Delta C_T$ de SOCS-3 dans les lymphocytes T CD4 était aussi faible que celui de SOCS-1. Sans ajout d'IL-27, les cellules contrôles avaient requis 12,40 cycles d'amplification pour détecter l'ARNm de SOCS-3. Une diminution minime a été enregistrée chez les cellules T CD4 stimulées avec l'IL-27, en atteignant un nombre de cycles égal à 11,20. Ceci a abouti à un $\Delta\Delta C_T = 1,25$, donc il s'agit aussi d'une augmentation double ($2^{1,25}$) (Figure 16 B et 17 B). L'IL-27 induisait une augmentation similaire des SOCS-1 et SOCS-3 (entre 1,5 et 2) dans un même sous-type cellulaire. De plus, encore une fois nous prouvons que les cellules T CD8 répondaient plus efficacement à l'IL-27 que les CD4. Notons qu'à la figure 17, l'augmentation en ARNm est légèrement différente par rapport aux valeurs $\Delta\Delta C_T$ moyennes calculés à la figure 16 puisqu'il s'agit de données brutes compilées ensemble tenant compte des barres d'erreurs entre les donneurs. Toutefois cette différence minime n'était pas considérable.

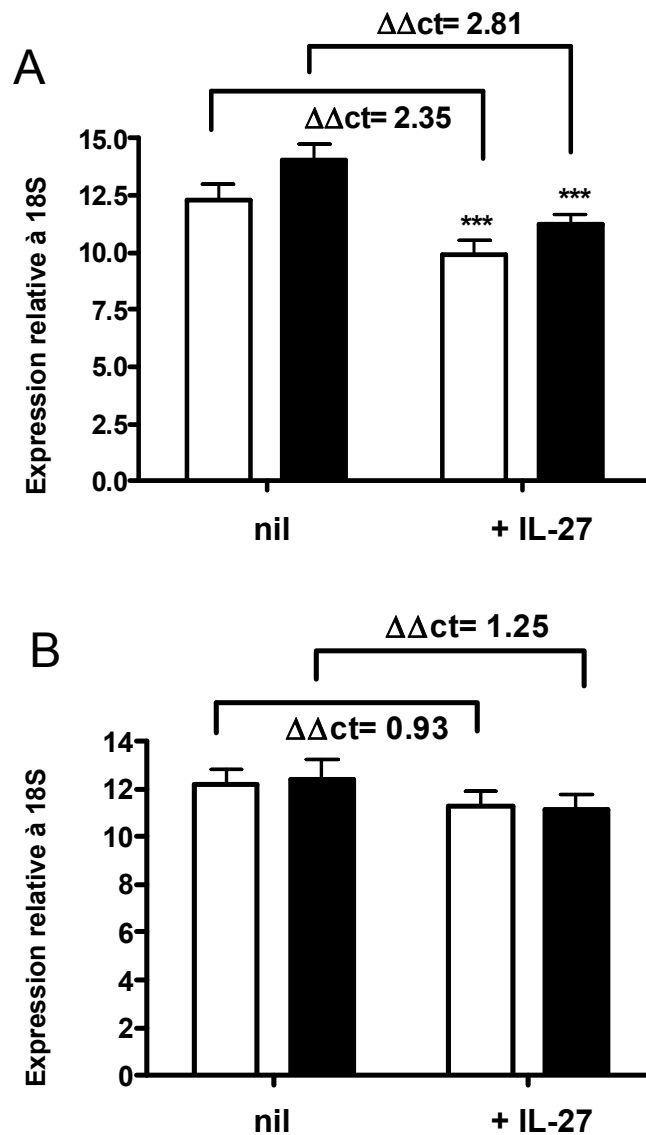


Figure 16 : Comparaison des $\Delta\Delta\text{ct}$ des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 vs T CD4 en réponse à l'IL-27

L'expression des SOCS-1 vs. SOCS-3 a été comparée par rapport à l'ARN ribosomal 18S et non aux CD. Ces résultats sont représentés sous forme de $\Delta\Delta\text{ct}$. Les valeurs $\Delta\Delta\text{ct}$ ont été calculées dans les cellules T CD8 et T CD4 sans traitement (nil) vs. celles qui ont été stimulées avec IL-27 pour 60 minutes. ***signifie <0.001

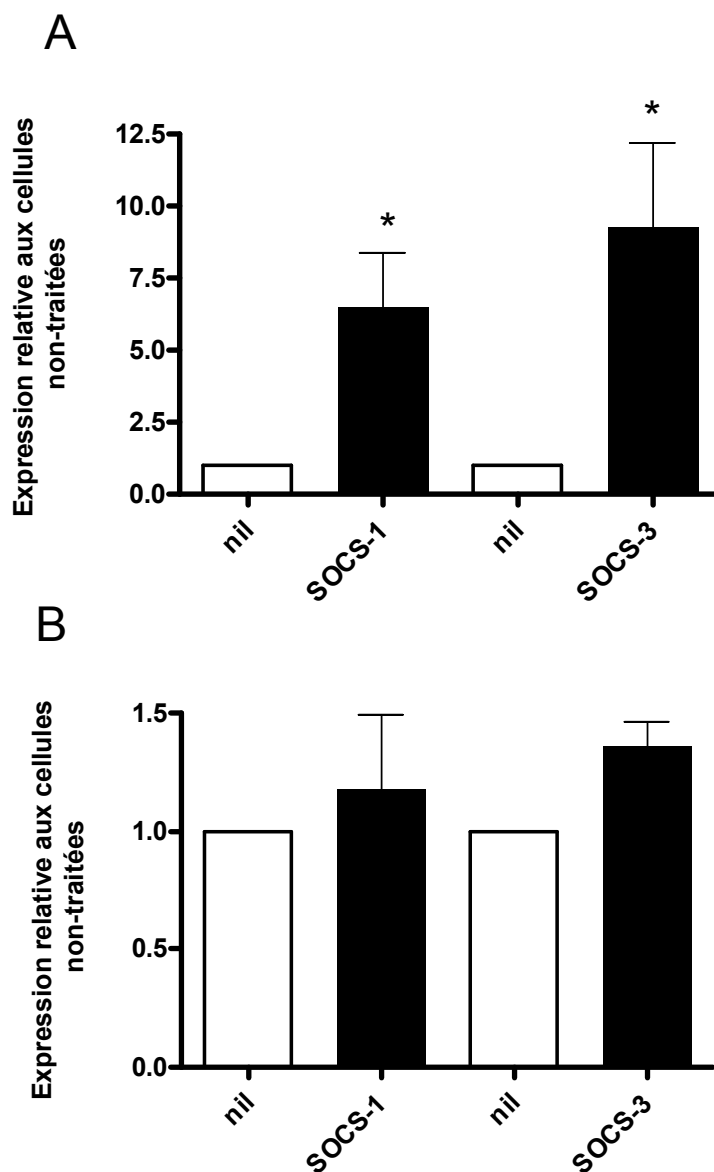


Figure 17: Comparaison des $2^{\Delta\Delta ct}$ des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 et CD4 en réponse à l'IL-27

L'amplification de l'expression des SOCS-1 vs. SOCS-3 a été comparée par rapport à l'ARN ribosomal 18S des cellules non traitées. Ces résultats ont d'abord été calculés en $\Delta\Delta ct$ puis représentés sous forme de puissance $2^{\Delta\Delta ct}$. Ces valeurs ont été étudiées dans les cellules T CD8 (panneau A) et CD4 (panneau B) sans traitement nil vs. stimulées avec l'IL-27 pour 60 minutes. ***signifie $p < 0,001$.

2.4 Comparaison des effets de l'IFN- β et de l'IL-27 sur les lymphocytes T.

En se basant sur les valeurs obtenues au niveau des $\Delta\Delta Ct$, nous avons pu comparer les effets de l'IFN- β et de l'IL-27 sur l'expression en ARNm des SOCS-1 et SOCS-3 par les cellules T CD8 et CD4. Nous avons démontré que l'IFN- β avait un impact équivalent sur nos deux-types cellulaires de même que sur les deux transcrits de SOCS. Dans les cellules T CD8, le SOCS-1 avait un $\Delta\Delta Ct = 2,52$ alors qu'au niveau des cellules T CD4 le $\Delta\Delta Ct$ pour la même molécule était de 2,28. Quant au degré d'expression du SOCS-3 dans les cellules T CD8, il atteignait un $\Delta\Delta Ct = 2,56$ vs. 2,13 dans les cellules T CD4. Donc, ces résultats suggèrent que l'IFN- β a agi avec une intensité équipollente sur les cellules T CD8 et CD4 ainsi que sur nos deux molécules SOCS. Par contre, l'IL-27 avait un effet plus important sur les SOCS-1 et SOCS-3 préférentiellement dans les cellules T CD8 en atteignant des $\Delta\Delta Ct$ de 2,35 et 2,81 respectivement. En contre partie, dans les cellules T CD4, les SOCS-1 et SOCS-3 semblaient moins influencés par l'IL-27 en marquant des $\Delta\Delta Ct$ assez faibles de 0,93 et 1,25 respectivement (moyenne =1,1). Afin d'évaluer en parallèle l'impact des deux cytokines l'IFN- β et l'IL-27 à la fois dans une même cellule et sur le même transcrit de SOCS nous avons comparé toutes les valeurs de $\Delta\Delta Ct$ (voir Tableau 8). Nous avons remarqué que l'IFN- β en plus d'avoir un même impact sur les T CD8 et CD4 et leur transcrits correspondants, il semblait avoir un effet similaire et quasi-identique quant à l'influence de l'IL-27 sur les cellules T CD8 uniquement, en ayant tous des $\Delta\Delta Ct$ très rapprochés. Leur valeur moyenne était de 2,44; ceci suggère une augmentation en ARNm de plus de quatre fois ($2^{2,44}$) pour les SOCS. Par contre, l'IL-27 a induit une augmentation d'expression uniquement de deux fois pour les deux molécules dans les cellules T CD4 ($2^{1,1}$). Donc, l'IL-27 et l'IFN- β agissaient avec la même puissance sur les T CD8 mais pas sur les T CD4; l'IL-27 semble avoir eu moins d'effet sur les cellules T CD4 en comparaison avec celles qui ont été stimulées avec l'IFN- β .

Tableau 8: Effets de chacune des cytokines IFN- β et IL-27 sur les cellules T.

Cytokine	Cellules T	$\Delta\Delta C_T$ (SOCS-1)	$\Delta\Delta C_T$ (SOCS-3)	Effet
IFN- β	T CD8	2,52	2,56	+++
	T CD4	2,28	2,13	+++
IL-27	T CD8	2,35	2,81	+++
	T CD4	0,93	1,25	+

Légende : Tableau démontrant les effets de chacune des cytokines: IFN- β et IL-27 sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 par les cellules T CD8 et CD4 selon les $\Delta\Delta C_T$ (en ARNm) . +++ : effet élevé; + : effet faible. Les $\Delta\Delta C_T$ ont été calculés par rapport au gène contrôle 18S. (Il s'agit de quatre donneurs pour chacun des cas).

3.0 IFN- β et IL-27 induisent SOCS-1 et SOCS-3 au niveau protéique dans les lymphocytes T humains

Nos résultats précédents ont démontré que l'IFN- β et l'IL-27 ont pu induire les SOCS-1 et SOCS-3 au niveau de l'ARNm dans les lymphocytes T. Dans le but de prouver aussi une induction au niveau protéique, nous avons stimulé des PBMC de donneurs sains avec chacune des cytokines et nous avons quantifié l'expression des SOCS par immunocytochimie. L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été étudiée au niveau des lymphocytes T CD8 et CD4. Notons que nous avons essayé de détecter les protéines SOCS-1 et SOCS-3 par la technique d'immunobuvardage de type Western. Toutefois, ces tentatives ont été sans succès malgré les nombreuses optimisations auxquelles nous avons eu recours; telles l'utilisation de différents anticorps primaires (polyclonaux et monoclonaux), l'augmentation du temps de blocage de la membrane pour empêcher le bruit de fond (lait 5%+ PBS), une prolongation de la période d'incubation avec les anticorps primaires (quelques heures ou toute la nuit), différentes lignées cellulaires ont été mises à l'essai telles que les cellules immortalisées A549 et Ramos, les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Nous avons aussi testé divers tampons de lyse cellulaire déjà utilisés par des collègues et qui avaient bien fonctionné pour d'autres protéines. De plus, nous avons remplacé le produit de détection par chimioluminescence (ECL) par un autre plus performant et plus sensible (ECL plus), mais sans succès. C'est pourquoi nous avons opté pour une approche par immunocytochimie déjà réalisée pour la détection des SOCS-1 et SOCS-3 dans des cellules humaines (Isomaki et al., 2007).

En appliquant la technique d'immunocytochimie, nous avons bel et bien pu visualiser les SOCS au niveau protéique dans les cellules lymphocytaires. Pour ce faire, les PBMC de deux donneurs sains ont été stimulées ou non pendant trois heures de temps avec 250 ng/ml d'IL-27 ou avec 1 000 U/ml d'IFN- β . Nous avons pris des photos de cinq champs distincts pour chacun des SOCS-1 ou SOCS-3 avec les marquages CD4 ou CD8. Des champs de microscopie représentatifs sont illustrés aux figures 18 et 19. Un champ représentatif de lymphocytes T CD4 stimulés avec l'IFN- β (première rangée) ou avec l'IL-27 (deuxième rangée) exprimant les protéines SOCS-1 a été présenté (Figure 18). A la figure 19, nous pouvons détecter l'expression des SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 stimulés avec l'une ou l'autre des cytokines. Les marquages complémentaires (SOCS-3 et

CD4 ou SOCS-1 et CD8) étaient similaires. Les témoins isotypiques ont bel et bien démontré la spécificité de nos anticorps car aucun signal n'était détecté pour les deux fluorochromes (FITC ou Cy3). Nous avons compté le nombre de cellules exprimant CD8 ou CD4 et étant positive ou non pour le SOCS-1 ou SOCS-3 pour chacun des champs. Les résultats d'un donneur sont présentés aux tableaux 9, 10, 11 et 12 pour les valeurs (en %) de cellules positives pour SOCS-1/SOCS-3 dans cinq champs représentatifs provenant d'un seul donneur.

Dans les cellules T CD8 (Figure 20 A), les deux cytokines ont augmenté notablement la proportion de cellules exprimant les protéines des SOCS-1 et SOCS-3. Environ 48% de ces cellules non-stimulées exprimaient le SOCS-1. Suite à la stimulation avec l'IFN- β (1 000 U/ml), nous avons observé une augmentation pour atteindre une valeur de 90% des cellules positives pour SOCS-1, soit à peu près deux fois plus de cellules qui exprimaient des niveaux détectables de protéines que les cellules non stimulées. Toutefois, le SOCS-3 était moins exprimé que le SOCS-1 dans les cellules non traitées, ce qui a aussi été observé au niveau de l'ARNm, ceci suggère une corrélation entre l'expression protéique et l'expression en ARNm. Trente pourcent (30%) des cellules sans traitement exprimaient le SOCS-3 alors que cette proportion a grimpé à 80% lorsqu'elles étaient stimulées avec l'IFN- β , ce qui signifie qu'il y a eu une augmentation de 2,6 fois de cellules exprimant la protéine SOCS-3. L'IL-27 a été aussi efficace que l'IFN- β ; les cellules stimulées ont atteints des niveaux de 80 % et 70% exprimant des niveaux détectables pour les SOCS-1 et SOCS-3 respectivement.

Au niveau des cellules T CD4 (Figure 20 B), nous avons observé un profil semblable et qui concordait avec les résultats en ARNm. Suite à la stimulation avec l'IFN- β , les taux protéiques des SOCS-1 et SOCS-3 ont tous les deux marqué une valeur proche de 80% en comparaison avec 45% et 30% des cellules non stimulées. Ce qui entraînait donc une augmentation à peu près du double des cellules qui exprimaient des niveaux détectables de ces protéines. Quant à l'influence par l'IL-27, les protéines SOCS-1 et SOCS-3 ont subi une induction moins notable qu'avec l'IFN- β . Les quantités moyennes de SOCS-1 ont été augmentées de 1,3 fois; 65% des cellules stimulées comparativement à 50% pour les cellules non stimulées. L'expression de SOCS-3 a été induite avec un facteur de 1,8 fois : 74% des cellules stimulées étaient positives contre 40% des cellules contrôles. Ceci semble bien concorder avec nos résultats en ARNm (voir section 2.2). Même à la plus haute dose

utilisée, l'IL-27 (250 ng/ml) avait induit les protéines SOCS-1 et SOCS-3 de manière préférentielle dans les lymphocytes T CD8. Toutefois dans les cellules T CD4, SOCS-3 a été légèrement mieux augmenté par rapport au SOCS-1.

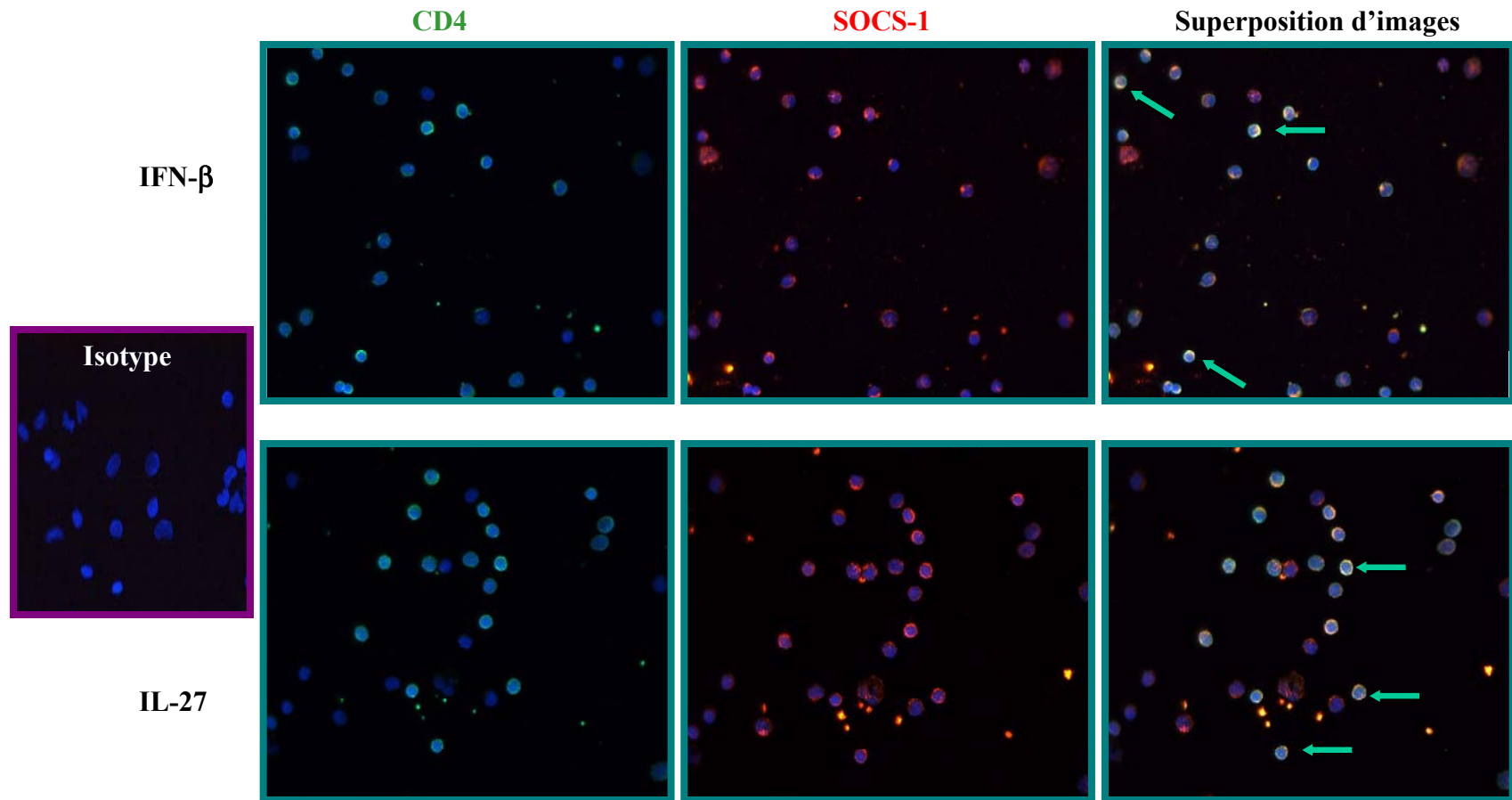


Figure 18: Visualisation de l'expression protéique du SOCS-1 dans les lymphocytes T CD4 en réponse à l'IFN- β et l'IL-27
 Les PBMC ont été traitées avec l'IFN- β (1 000 U/ml- rangée du haut) ou l'IL-27 (250 ng/ml-rangée du bas) pendant trois heures puis mises sur lames, fixées et marquées pour le CD4 et le SOCS-1. Un champ représentatif de microscopie pour chacune des conditions est illustré. Le marquage pour le CD4 a été observé en vert, celui du SOCS-1 en rouge et les noyaux ont été marqués au Hoechst (bleu). L'isotype a été ajouté pour démontrer la spécificité du marquage (à gauche). Les flèches vertes dans les panneaux de droite (images superposées) indiquent des exemples de cellules qui sont à la fois positives pour le marqueur CD4 et le SOCS-1. (Images prises à un grossissement de 400X).

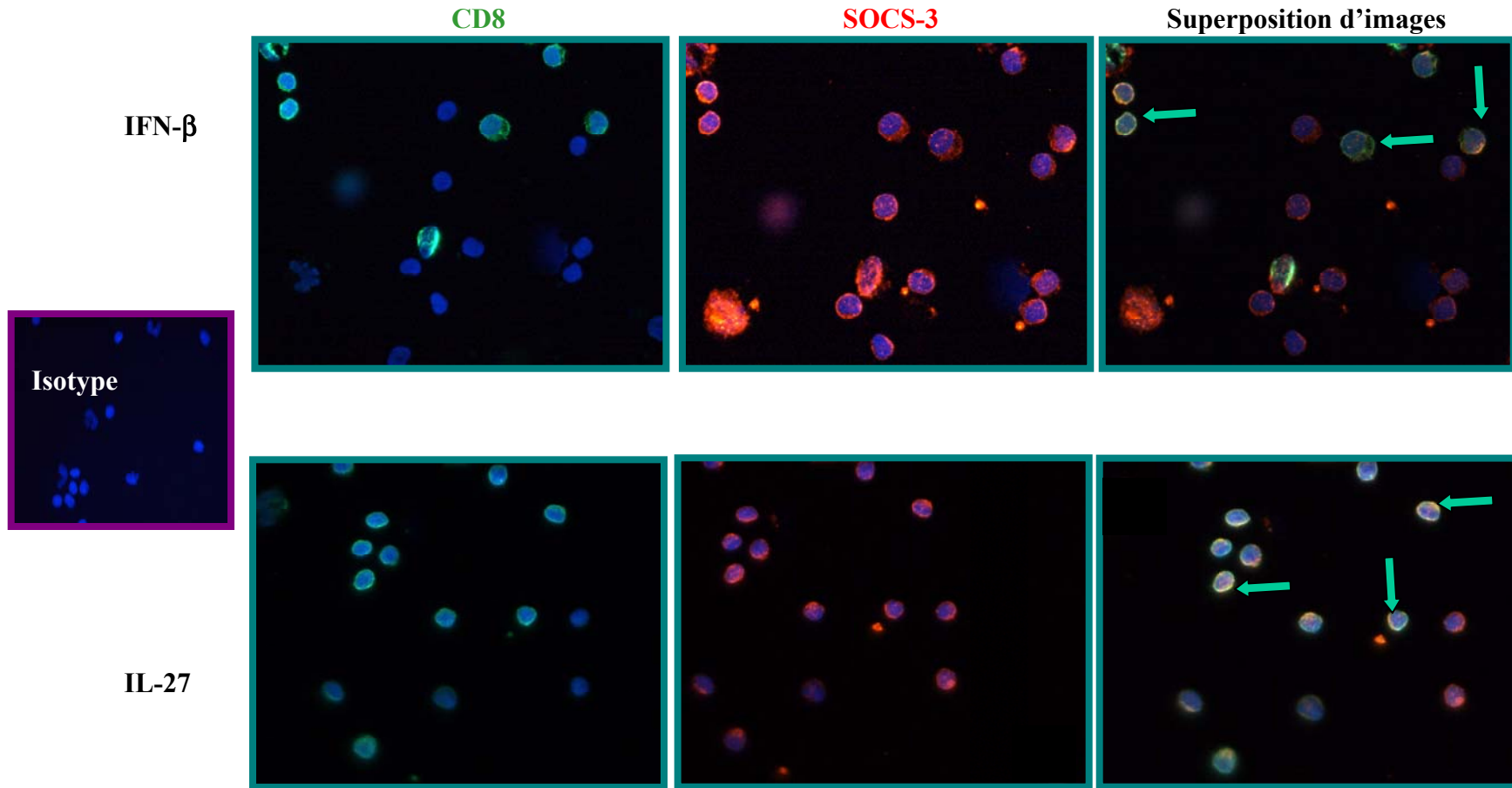


Figure 19: Visualisation de l'expression protéique du SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 en réponse à l'IFN- β et l'IL-27. Les PBMC ont été traitées avec l'IFN- β (1 000 U/ml- rangée du haut) ou l'IL-27 (250 ng/ml-rangée du bas) pendant trois heures puis mises sur lames, fixées et marquées pour le CD8 et le SOCS-3. Un champ représentatif de microscopie pour chacune des conditions est illustré. Le marquage pour le CD8 a été observé en vert, celui du SOCS-3 en rouge et les noyaux ont été marqués au Hoechst (bleu). L'isotype a été ajouté pour démontrer la spécificité du marquage (à gauche). Les flèches vertes dans les panneaux de droite (images superposées) indiquent des exemples de cellules qui sont à la fois positives pour le marqueur CD8 et le SOCS-3. (Images prises à 400X)

Tableau 9: Expression protéique de SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD8 en réponse à l'IFN- β .

	Non-traitées		Traitées IFN- β		Non-traitées		Traitées IFN- β	
	CD8+	CD8+ SOCS1+	CD8+	CD8+ SOCS1+	CD8+	CD8+ SOCS3+	CD8+	CD8+ SOCS3+
Champ 1	10	4	5	5	7	4	9	8
Champ 2	6	3	5	5	10	5	11	10
Champ 3	8	5	8	6	13	7	5	5
Champ 4	8	4	9	7	5	3	7	7
Champ 5	15	7	13	11	11	3	13	11
Total	47	23	40	34	46	22	45	41
Pourcentage	49		85		48		91	

Tableau 10: Tableau de comparaison des cellules T CD8 exprimant SOCS-1/SOCS-3 en réponse avec l'IL-27

	Non-traitées		Traitées IL-27		Non-traitées		Traitées IL-27	
	CD8+	CD8+ SOCS1+	CD8+	CD8+ SOCS1+	CD8+	CD8+ SOCS3+	CD8+	CD8+ SOCS3+
Champ 1	12	5	10	10	8	3	9	8
Champ 2	7	4	7	6	12	4	17	15
Champ 3	5	3	12	10	7	3	5	5
Champ 4	11	4	9	7	5	3	9	7
Champ 5	15	7	16	15	13	7	10	10
Total	50	23	54	48	45	20	50	45
Pourcentage	46		89		44		90	

Tableau 11: Tableau comparatif des cellules T CD4 exprimant SOCS-1/SOCS-3 en réponse avec l'IFN- β

	Non-traitées		Traitées IFN- β		Non-traitées		Traitées IFN- β	
	CD4+	CD4+ SOCS1+	CD4+	CD4+ SOCS1+	CD4+	CD4+ SOCS3+	CD4+	CD4+ SOCS3+
Champ 1	20	10	21	20	26	19	24	22
Champ 2	12	3	14	12	10	5	11	10
Champ 3	22	15	13	11	16	6	14	14
Champ 4	16	10	9	8	10	4	7	7
Champ 5	13	7	15	14	14	5	12	11
Total	81	45	72	65	76	39	68	64
Pourcentage		55		90		51		94

Tableau 12: Tableau de comparaison des cellules T CD4 exprimant SOCS-1/SOCS-3 en réponse à l'IL-27

	Non-traitées		Traitées IL-27		Non-traitées		Traitées IL-27	
	CD4+	CD4+ SOCS1+	CD4+	CD4+ SOCS1+	CD4+	CD4+ SOCS3+	CD4+	CD4+ SOCS3+
Champ 1	15	9	7	5	23	17	12	8
Champ 2	6	3	18	5	10	5	25	20
Champ 3	10	5	8	6	10	7	13	10
Champ 4	20	11	22	19	12	4	7	4
Champ 5	17	7	13	11	20	7	10	6
Total	68	36	68	34	75	40	67	48
Pourcentage		53		50		53		72

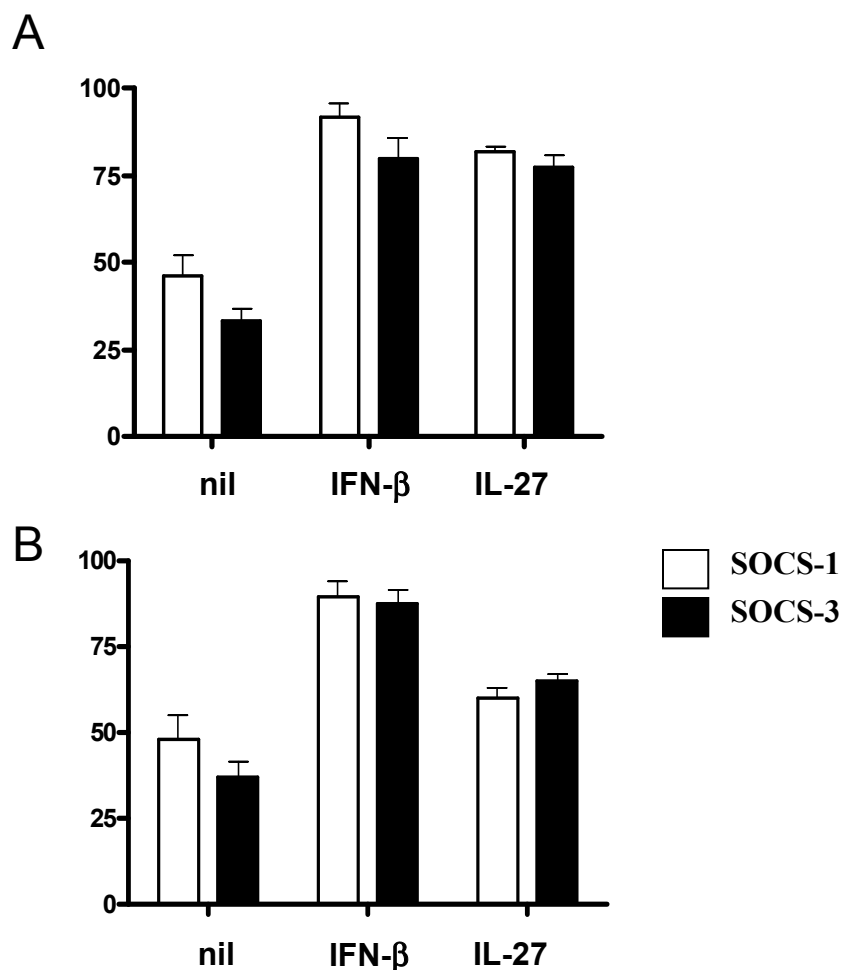


Figure 20: Expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau protéique

Des PBMC ont été mises en culture avec l'IFN- β (1 000 U/ml) ou l'IL-27 (250 ng/ml) ou gardées sans traitement, pendant 3 heures à 37°C (sur l'abscisse). Les cellules ont été récoltées à chacun de ces intervalles. L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a été quantifiée par immunocytochimie spécifiquement dans les lymphocytes T CD8 (figure A) et CD4 (figure B). Les deux figures représentent une compilation de résultats de cinq champs obtenus à partir de 2 donneurs sains. Les cellules nil réfèrent au contrôle.

DISCUSSION

Une protection immunitaire efficace consiste en une communication adéquate entre les différentes composantes du système immunitaire. Vu leurs larges spectres d'activités, les cytokines sont des médiateurs essentiels permettant d'assurer un processus harmonieux entre les acteurs de la branche innée et ceux de la branche adaptative de ce système complexe. Donc, les cytokines jouent un rôle crucial et clé permettant au système immunitaire de proportionner sa riposte en cas d'agression. Toutefois, une défaillance au niveau de la production et/ou de l'activité des cytokines contribue à plusieurs pathologies dont les maladies auto-immunes. La régulation positive des cytokines est assurée, principalement, par les voies JAK-STAT. Toutefois les mécanismes de contrôles négatifs ont été moins étudiés jusqu'à maintenant.

La famille des SOCS (*'Suppressors Of Cytokine Signalling'*), récemment découverte, regroupe des protéines intracellulaires douées pour contrôler l'impact des cytokines, en agissant comme régulateurs négatifs de différentes cascades de signalisation activées, dont la plus importante est la voie JAK-STAT. Plusieurs études ont montré l'importance de ces molécules, particulièrement les SOCS-1 et SOCS-3 dans le maintien de l'intégrité du système immunitaire. Une déficience pour un de ces gènes chez les souris a entraîné diverses complications. Toutefois, très peu d'informations sont disponibles quant à l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 par les lymphocytes T humains.

L'IFN- β et l'IL-27 sont deux cytokines qui ont un impact élevé sur le système immunitaire. L'IFN- β fait partie de la famille des IFN de type I et est spécialisé dans la protection antivirale, de plus, cette cytokine joue un rôle fondamental pour favoriser la communication adéquate entre l'immunité innée et adaptative (Muller et al., 1994). L'IFN- β est impliqué dans le développement de différents types cellulaires tels les CD et les macrophages, ajoutons son influence indispensable sur le fonctionnement des lymphocytes T, B et les cellules NK (Vosslamber et al., 2009). Quant à l'IL-27, cette cytokine est caractérisée par son aspect pléiotropique sur le système immunitaire. Certaines études ont mis l'accent sur ses attributs pro-inflammatoires en démontrant son implication dans la polarisation des cellules T en profil Th1 (Lucas et al., 2003; Larousserie et al., 2004). En plus de ces caractéristiques, l'IFN- β et l'IL-27 ont un potentiel immunorégulateur, qui semble être prometteur dans plusieurs maladies auto-immunes et qui nécessite une meilleure élucidation. Dans plusieurs contextes, ces cytokines jouent un rôle anti-inflammatoire et protègent des modèles animaux contre l'apparition et/ou la progression de

certaines maladies auto-immunes telle que l'EAE. Quelques études ont associé l'IFN- β et l'IL-27 à une amélioration des capacités cellulaires à l'inhibition des médiateurs pro-inflammatoires. Toutefois, ces mécanismes demeurent faiblement élucidés. De manière intéressante, certains groupes ont établi des liens probables entre l'action de ces deux cytokines et l'induction des SOCS-1 et SOCS-3, sauf que ces informations sont très restreintes et limitées aux lignées cellulaires ou aux modèles animaux.

1.0 L'IFN- β et l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T humaines

1.1 Exposition aiguë à l'IFN- β

1.1.1 L'expression des SOCS-1 et SOCS-3 varie selon le sous-type lymphocytaire

Afin d'étudier l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 et CD4 en réponse à l'IFN- β , nous nous sommes basés sur les informations de la littérature, certaines études ont tracé des pistes préliminaires en fournissant plusieurs paramètres clés. Un groupe a déjà démontré que les transcrits des deux SOCS ont été induits suite à une stimulation avec l'IFN- α (Zimmerer et al., 2007). Rappelons que, l'IFN- α et - β partagent plusieurs caractéristiques et se lient au même récepteur qui est formé des sous-unités IFNAR-1 et IFNAR-2. De plus, l'IFN- α et - β empruntent la même cascade de signalisation pour transmettre le message soit, en activant les molécules JAK1 et TYK2, puis elles induisent la phosphorylation principalement des STAT1 et STAT2 qui vont se transloquer dans le noyau et se lier aux gènes spécifiques (ISG/ GAS) (Yeh and Pellegrini, 1999). De manière intéressante, Zimmerer et collègues ont démontré que les ARNm codants pour les SOCS-1 et SOCS-3 ont été induits dans des PBMC humains de donneurs sains suite à une stimulation avec l'IFN- α (utilisé pour le traitement des mélanomes et des infections chroniques du virus hépatite C). De plus, ce même groupe a observé une induction des SOCS-1 et SOCS-3 en ARNm dans des lymphocytes T humains et des cellules NK en réponse à l'IFN- α . Ils ont effectué une cinétique d'activation avec une dose élevée de 10^4 U/ml d'IFN- α ; les cellules T ont été stimulées selon un intervalle variant entre une heure et quatre heures (Zimmerer et al., 2007). L'induction en ARNm était rapide; pour le SOCS-1 le pic d'expression était après quatre heures tandis que le SOCS-3 a atteint son taux maximal après deux heures de stimulation. Les PBMC semblent répondre plus rapidement soit un pic du SOCS-1 après deux heures vs. une heure pour SOCS-3. Une autre étude récente a aussi servi de référence, cette dernière était axée sur l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 mais cette fois-ci en réponse à l'IFN- β dans une lignée primaire d'astrocytes de souris (Qin et al., 2008). Ces auteurs ont démontré qu'avec une dose plus faible que l'étude précédente, égale à 100 U/ml d'IFN- β , les ARNm codant pour les SOCS-1 et SOCS-3 ont aussi été induits rapidement après 30 minutes de stimulation. Ils ont pu atteindre des taux

élevés en ARNm après quatre et deux heures respectivement, puis diminuent au niveau basal. Ce qui est très constant avec les observations du groupe précédent.

Comme déjà mentionné, l'IFN- β agit comme immunorégulateur capable de moduler les réponses inflammatoires au niveau du système immunitaire. Les mécanismes qui participent à cette modulation demeurent moins bien élucidés. Ainsi dans le but de déterminer si l'IFN- β est capable d'affecter le potentiel anti-inflammatoire des lymphocytes T humains en augmentant les SOCS-1 et SOCS-3, nous avons commencé par étudier son effet sur l'expression en ARNm de nos deux transcrits. Ainsi à la lueur des données de la littérature, nous avons établi une cinétique des SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à une dose de 10^3 U/ml d'IFN- β , jugée suffisante pour l'induction. Selon la première étude, cette concentration a induit des niveaux assez significatifs des SOCS-1 et SOCS-3. Les lymphocytes T CD8 et CD4 provenant de donneurs sains ont donc été stimulés pendant 30, 60, 120 et 180 et 240 minutes avec l'IFN- β . Ici aussi, nous avons remarqué la rapidité d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 déjà après 30 minutes dans les deux sous-types cellulaires. Nous avons observé dans les lymphocytes T CD8 des résultats homogènes entre les différents donneurs (Figures 6 A et B) autant pour les SOCS-1 et SOCS-3, avec un pic d'expression après 60 minutes seulement, suivi d'une rechute permettant aux transcrits de revenir au niveau initial et ce, après trois à quatre heures de stimulation. Par contre, les lymphocytes T CD4 (Figures 7 A et B) ont montré une réponse des SOCS-1 et SOCS-3 en plateau qui s'étendait environ entre 30 et 180 minutes puis une rechute décalée par rapport aux lymphocytes T CD8. Les cinétiques que nous avons obtenues respectent les intervalles d'expression des SOCS-1 et SOCS-3 publiés dans la littérature, mais nos pics d'expression étaient plus rapides que ce que les autres ont rapporté. Nous avons aussi montré que dans les cellules non stimulées les niveaux des transcrits des SOCS étaient très bas mais rapidement augmentés après la stimulation avec l'IFN- β , ce qui a été démontré dans des lignées immortalisées, des lymphocytes T et des macrophages de souris (Crespo et al., 2000; Krebs and Hilton, 2000; Hebenstreit et al., 2005).

De manière intéressante, il semble que nos deux sous-types lymphocytaires présentaient des profils de cinétique différents; les lymphocytes T CD4 ont paru plus sensibles à l'IFN- β , puisqu'elles exprimaient les SOCS-1 et SOCS-3 pendant un intervalle

de temps plus long en comparaison avec les lymphocytes T CD8. Alors que ces derniers ont montré une diminution rapide du niveau des transcrits déjà après deux heures de stimulation. Il est possible que ces observations s'expliquent par des niveaux plus élevés du récepteur de l'IFN- β par les cellules T CD4 comparativement à leurs homologues les CD8. Toutefois, dans la littérature, il existe très peu d'études comparatives sur le niveau d'expression des sous-unités de ce récepteur chez divers types cellulaires et particulièrement les sous-types lymphocytaires. Dans une récente étude, il a été démontré que le récepteur des IFN de type I est exprimé en densité élevée sur les PBMC humains. L'IFNAR est aussi observé à la surface de la majorité des lymphocytes T soit les cellules T CD8 et CD4. Mais leur niveau d'expression du récepteur des IFNs de type I est assez bas, il est toutefois détectable (Pogue et al., 2004). Ces auteurs n'avaient pas décelé une différence notable des taux d'IFNAR-1 et IFNAR-2 (en protéines) entre les deux types lymphocytaires T CD4 et CD8. Donc notre hypothèse suggérant que les cellules T CD4 expriment davantage des récepteurs à l'IFN- β ne peut expliquer la cinétique des SOCS en plateau dans ces cellules.

Les processus de circulation intracellulaire des sous-unités de l'IFNAR et leur acheminement à la surface des cellules demeurent aussi faiblement élucidés. Il a été démontré, dans des cellules humaines de fibrosarcomes, que TYK2 (membre de la famille JAK) étant constitutivement lié à la sous-unité IFNAR-1, était responsable d'assurer une affinité élevée du récepteur et de soutenir son expression à la surface cellulaire (Gauzzi et al., 1996). De plus, une étude plus récente a prouvé ceci au niveau de cellules transfectées, de sorte que dans les cellules déficientes en TYK2, les sous-unités IFNAR-1 étaient localisées dans des compartiments endosomaux périnucléaires. Alors qu'en présence de TYK2, les niveaux d'IFNAR-1 étaient notablement augmentés à la surface cellulaire. TYK2 avait protégé les IFNAR-1 contre l'internalisation et la dégradation (Ragimbeau et al., 2003). Il serait intéressant de quantifier la distribution de cette sous-unité à la surface des lymphocytes T CD8 vs. CD4 à différents intervalles de temps, ce qui pourrait en partie expliquer la sensibilité plus prolongée des cellules T CD4 à l'IFN- β . En parallèle, on pourrait aussi mesurer et comparer la phosphorylation de TYK2 dans les deux types cellulaires. D'autre part, nous avons mentionné plus tôt (section 4.2, p.52) qu'il existe trois formes de la chaîne IFNAR-2 soit IFNAR-2a, IFNAR-2b, et IFNAR-2c (Mogensen et al.,

1999; Taniguchi et al., 2007). L'IFNAR-2c semble être le plus impliqué dans cascade déclenchée par les IFN- α/β , en revanche les formes IFNAR-2a et IFNAR-2b ont été impliquées dans la suppression de la signalisation de ces IFNs de type I (Pfeffer et al., 1997). Il est possible que les cellules T CD8 possèdent un taux d'IFNAR-2a et IFNAR-2b plus élevé que les cellules T CD4 et qui ont la capacité d'interférer davantage avec la signalisation induite par l'IFN- β , donc ceci pourrait peut-être aboutir à une expression des SOCS-1 et SOCS-3 pendant un temps plus court dans ces cellules. La quantification de l'expression des IFNAR-2a et IFNAR-2b pourrait aussi contribuer à l'explication de nos observations.

1.1.2 Efficacité équivalente de l'IFN- β sur les SOCS-1 et SOCS-3

Au pic d'expression (60 minutes), nous avons démontré que l'IFN- β a agi avec une intensité très similaire sur les SOCS-1 et SOCS-3 et ce, dans les deux sous-types lymphocytaires (Figures 8 et 9). L'impact équivalent de l'IFN- β sur une même molécule SOCS dans les deux types de cellules T suggère que les taux d'IFNAR sont similaires à ce moment. Ce qui n'est pas le cas avec des stimulations plus prolongées. De plus, à 60 minutes, la signalisation induite pourrait aboutir à la formation d'un nombre de dimères STAT1-STAT2 à peu près égal, ce qui conduirait alors à une induction de SOCS-1 ou de SOCS-3 équivalente dans chacune des cellules T (pour SOCS-1 : $\Delta\Delta Ct = 2,52$ (CD8) vs. $2,28$ (CD4); pour SOCS-3 : $\Delta\Delta Ct = 2,56$ (CD8) vs. $2,13$ (CD4)). Le complexe STAT1-STAT2 est formé de manière restreinte en réponse aux IFNs de type I (Fu et al., 1990). Il s'associe à p48/IRF-9 pour former le complexe ISGF3. Ainsi, une fois transloqué dans le noyau, le complexe se lie préférentiellement à des ISGs (*IFN Stimulated Genes*) contenant des éléments amplificateurs tel que les ISRE (*IFN Stimulated Response Element*) conservés sur les promoteurs de plusieurs gènes dont les SOCS-1 et SOCS-3. Outre mesurer les niveaux d'IFNAR à la surface des T CD8 vs. CD4 après 60 minutes de stimulation, il serait aussi intéressant de quantifier en parallèle le nombre de complexes ISGF3 formés dans les deux types cellulaires. En plus d'avoir un effet équipollent sur un même transcript de SOCS dans deux types de cellules différentes, une exposition aigüe à l'IFN- β a agi pareillement sur les deux molécules SOCS distinctes (Figures 8 et 9). Ceci a d'ailleurs été démontré dans des PBMC humains et dans des lymphocytes T totaux

(Brender et al., 2001; Zimmerer et al., 2007), mais sans donner une explication concrète quant à l'égalité de l'induction des SOCS en réponse à l'IFN- α . De plus il a été démontré chez les astrocytes de souris des niveaux des SOCS-1 et SOCS-3 très proches, lorsque stimulés avec l'IFN- β (Qin et al., 2008), ce qui concorde avec nos résultats. Donc, en général les IFN de type I induiraient les SOCS-1 et SOCS-3 de façon concomitante dans plusieurs types cellulaires.

1.1.3 Induction de SOCS-1 et SOCS-3 aux doses thérapeutiques d'IFN- β

Après avoir établi une cinétique d'expression des SOCS-1 et SOCS-3, nous avons étudié les niveaux d'induction des transcrits des SOCS, en réponse à différentes doses d'IFN- β . Les concentrations variaient entre 0 et 10 000 U/ml, ce qui inclut des doses physiologiques. Les taux d'IFN- β mesurés au niveau du sérum des patients atteints de la SEP qui s'injectent régulièrement avec des formes recombinantes d'IFN- β , appartiennent à des intervalles de 120 à 475 U/ml (Khan et al., 1996). Ainsi la dose de 100 U/ml est considérée la plus rapprochée de cet intervalle. Par contre les valeurs élevées (1 000 et 10 000 U/ml) ont été incluses dans notre étude, afin de mimer les grandes quantités d'IFN- β qui pourraient être produites dans le microenvironnement suite à des stimulations des cellules. Au niveau de la dose réponse à l'IFN- β , nous observons des profils différents entre les deux types de cellules T. Dans les lymphocytes T CD8, nous remarquons que les ARNm codants pour les SOCS-1 et SOCS-3 ont été augmentés de manière dose-dépendente (Figure 10). Les cellules demeurent réceptives même aux doses élevées. Alors que les lymphocytes T CD4 ont une dose optimale à 1 000 U/ml où l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 a atteint son maximum et a diminué au-delà de cette valeur (Figure 11). Toutefois, le niveau des transcrits demeurait significativement élevé.

Il existe probablement des mécanismes cellulaires, tel que l'internalisation, permettant d'auto-réguler l'impact des molécules dont les IFNs. En fait, nous pouvons postuler que les lymphocytes T CD4 lorsqu'ils sont exposés à des concentrations intenses d'IFN- β provoquent une internalisation des récepteurs et une diminution de leur nombre à la surface membranaire. Toutefois, il n'y a pas d'informations disponibles sur les mécanismes d'internalisation des IFNAR chez les lymphocytes T, mais une publication

récente a étudié le comportement et l'expression du IFNAR dans une lignée immortalisée de cellules T Jurkat (Dupont et al., 2002). Celles-ci ont été stimulées avec différentes doses d'IFN- β (0-1000 U/ml) et ont subi une quantification protéique des sous-unités IFNAR-1 et IFNAR-2 à leur surface. Toutes les cellules non traitées exprimaient les deux sous-unités. A partir des doses modestes (62,5 U/ml), les taux d'IFNAR-1 avaient déjà chuté de sorte que 60% des cellules l'expriment encore. A la plus haute dose, les auteurs ont observé qu'uniquement 20% des cellules Jurkat exprimaient cette sous-unité. L'IFNAR-2 a légèrement été influencé; avec les différentes doses il a été enregistré une diminution aux alentours de 20%. De façon intéressante, la réduction du nombre d'IFNAR-1 membranaire a été inhibée à des températures basses (4°C) ou en présence de l'azide. Selon les auteurs ceci indique que la perte des sous-unités IFNAR-1 était dû à un mécanisme d'internalisation (Dupont et al., 2002). Ces observations peuvent bien expliquer et refléter la diminution de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD4 à partir de 1 000 U/ml d'IFN- β . Toutefois cette concentration ne concorde pas avec les observations du groupe, où une dose de 62,5 U/ml avait déjà un effet notable, ceci est potentiellement causé par les lignées cellulaires distinctes.

Quant aux lymphocytes T CD8, leur mécanisme d'internalisation pourrait être décalé par rapport aux CD4.

De manière intéressante, nous avons remarqué que dans les deux sous-types cellulaires, les SOCS-1 et SOCS-3 ont été induits aux doses physiologiques (100 U/ml), ce qui a été démontré dans une lignée de macrophages (RAW 264.7) et d'astrocytes de souris (Qin et al., 2006; Qin et al., 2008). Ceci indique que les SOCS-1 et SOCS-3 pourraient probablement faire partie du mécanisme d'action de l'IFN- β lorsqu'il est injecté aux patients. En fait, un groupe a rapporté dans un résumé de congrès non-publié que les quantités d'ARNm des SOCS-1 et SOCS-3 étaient moins élevées dans les échantillons de sang prélevés chez les personnes atteintes de SEP sans traitement, que chez ceux prélevés chez les témoins sains (Cross et al., 2005). La courbe dose-réponse que nous avons établi est importante puisqu'elle désigne les concentrations d'IFN- β nécessaires (100 U/ml) pour l'induction des SOCS-1 et SOCS-3. Donc, une diminution de ces quantités d'IFN- β circulant chez les patients pourrait affaiblir l'efficacité immunomodulatrice de cette cytokine chez ces derniers sous traitement.

L'exposition aiguë à l'IFN- β nous a permis d'élucider les caractéristiques des SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à l'IFN- β . Ces expériences ont fourni des informations qui ne sont pas présentes dans la littérature, surtout en ce qui concerne l'expression des SOCS au niveau des sous-types de lymphocytes T humains. Toutefois, les patients atteints de SEP, utilisant la thérapie des injections d'IFN- β recombinant, sont exposés régulièrement à cette cytokine; un aspect qui sera discuté ci-dessous.

1.2 L'exposition chronique à l'IFN- β induit différemment les SOCS-1 et SOCS-3

Une proportion significative des patients atteints de la SEP cyclique suivent un traitement de longue durée à base d'IFN- β administré de manière chronique. Les fréquences d'injections dépendent du type de médicament; certains sont administrés de façon hebdomadaire (Avonex^{md}), ou deux à trois fois par semaine pour les autres types (Betaferon^{md} et Rebif^{md} respectivement) (tiré de la page web de la Société canadienne de la sclérose en plaques). L'efficacité de ces traitements consiste en une diminution de la fréquence des poussées et du risque de progression de la maladie vers un handicap sévère (Paty and Li, 2001). L'IFN- β peut initier l'activation de différentes cascades cellulaires, ce qui aboutit à la transcription de divers gènes. Toutefois, les mécanismes d'action et les voies de signalisation déclenchés par l'IFN- β nécessitent toujours une clarification plus approfondie. Bien que sa répercussion thérapeutique peut être médiée par diverses voies, son effet bénéfique sur le système immunitaire demeure la conséquence la plus plausible dans l'amélioration de la SEP (Markowitz, 2007). Les lymphocytes T infiltrants sont largement impliqués dans l'aggravation de l'inflammation au sein du système nerveux central telle qu'observée chez les patients atteints de cette maladie. L'IFN- β a la capacité de limiter leurs réponses aux cytokines pro-inflammatoires et donc de diminuer leur activation et leur prolifération non contrôlées, ainsi que leur polarisation vers des sous-types considérés comme néfastes (tels que les Th17) (Chofflon, 2005; Hofstetter et al., 2009). Nous avons démontré plus tôt que l'IFN- β a pu induire les SOCS-1 et SOCS-3 suite à des expositions aiguës de courtes durées. Ce qui nous a conduits à chercher plus en profondeur le lien entre cet agent thérapeutique et les protéines SOCS. Surtout que ces dernières ont été impliquées dans l'atténuation de la sévérité de l'EAE (encéphalomyélite

autoimmune expérimentale), le modèle animal de la SEP le plus utilisé (Stark and Cross, 2006).

Nous voulions mimer ce qui se produit chez les patients atteints de la SEP qui sont sous traitement et particulièrement au niveau des lymphocytes T. Pour ce faire, nous avons traité des cellules T CD8 et CD4 de donneurs sains avec une dose physiologique d'IFN- β (100 U/ml) à chaque 48 heures, pour un total de trois doses par semaine (comme Rebif^{md}). Ensuite, nous avons étudié l'effet de la chronicité du traitement sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3. Jusqu'à date, aucune expérience semblable n'a été publiée. L'IFN- β a eu une efficacité similaire autant sur le SOCS-1 que sur le SOCS-3 (au pic d'expression), toutefois en réponse à la chronicité, les SOCS-1 et SOCS-3 ont été exprimés de manière différentielle. Après la première dose d'IFN- β (pendant 1 heure de stimulation), les SOCS-1 et SOCS-3 ont été induits significativement dans les deux types lymphocytaires (Figures 12 et 13). Ceci a été déjà démontré au cours des expériences de cinétiques, ce qui confirme de nouveau nos résultats avec d'autres donneurs sains. Après 48 heures d'incubation, le taux des SOCS-1 et SOCS-3 ont chuté pour atteindre des valeurs quasi-nulles dans le cas des lymphocytes T CD8 et des niveaux basaux dans les CD4. En fait la demie-vie d'élimination pour l'IFN- β est de une à deux heures dans l'organisme, toutefois les concentrations sériques peuvent être mesurées jusqu'à quatre heures (Arnaud, 2002). Ce qui pourrait suggérer que les taux des SOCS eurent probablement diminué déjà avant les 48 heures. Lorsque nous avons traité nos cellules avec la deuxième dose d'IFN- β , le SOCS-1 a été de nouveau induit sauf que les niveaux de SOCS-3 n'ont point changé par rapport aux cellules contrôles (48 heures). Après deux autres jours (96 heures), nous avons observé des résultats similaires; les cellules T n'ayant pas reçu de doses additionnelles d'IFN- β ont montré des niveaux des SOCS-1 et SOCS-3 très bas (identiques aux échantillons de 48 heures). Toutefois, les cellules qui ont été stimulées pour une troisième fois avec l'IFN- β , ont notablement augmenté le taux d'ARNm codant pour le SOCS-1 mais non pour le SOCS-3. Nos résultats suggèrent que les lymphocytes T CD8 et CD4 sont devenus réfractaires quant à l'induction de l'expression de SOCS-3 lorsqu'ils étaient stimulés de façon chronique à l'IFN- β .

Lorsque l'IFN- β se lie à son récepteur, il induit principalement l'activation de JAK1 et TYK2 entraînant à leur tour la dimérisation de STAT1-STAT2, qui se lient aux éléments IRSE. Cette voie empruntée par l'IFN- β reste largement appréciée au niveau de la

littérature. Toutefois, certaines publications ont proposé des voies de signalisation additionnelles qui restent beaucoup moins élaborées telle que la formation des hétérodimères STAT1-STAT3 et les homodimères STAT1-STAT1 et STAT3-STAT3. Ces derniers peuvent se lier à des éléments GAS au niveau des promoteurs et induire la transcription des gènes (Decker et al., 2005; Plataniias, 2005; Noppert et al., 2007). De plus, très récemment, une étude a démontré que le STAT3 est indispensable pour l'induction du SOCS-3 et non du SOCS-1, et ce en réponse à l'IFN- β dans une lignée d'astrocytes (Qin et al., 2008). D'autre part ce même groupe a démontré que le STAT1 est critique pour la transcription du SOCS-1 et pas du SOCS-3 en réponse à l'IFN- β . Ainsi, en se basant sur ces travaux, l'induction du SOCS-1 après chaque traitement, dans notre projet, peut être expliquée par le fait que le STAT1 n'a pas été affecté ou désensibilisé par la chronicité. En revanche, il semblerait que la phosphorylation de STAT3 est restreinte à des expositions très courtes à l'IFN- β , donc l'expression du SOCS-3 en dépendrait. Une exposition chronique à l'IFN- β diminuerait alors la probabilité de formation des dimères constitués de STAT3 soit STAT1-STAT3 et/ou STAT3-STAT3. Probablement que le STAT3 est induit de manière préférentielle par d'autres cytokines, citons celles qui se lient aux récepteurs ayant les chaînes communes γ (IL-2, IL-7, IL-9, IL-15) et gp130 (IL-6, IL-27 etc.) (voir Tableau 3, p.34). Il serait très intéressant d'établir un profil de phosphorylation des STATs en parallèle avec l'expression des transcrits des SOCS. En fait, très peu d'informations associent une molécule de STAT particulière avec l'induction d'un transcrit de SOCS spécifique. Des expériences permettant de bloquer l'expression des STATs (par des ARN silencieux), seront aussi un bon outil afin d'élucider les différentes voies cytokines-STAT-SOCS.

Nos résultats sur la chronicité suggèrent que les patients sous traitement d'IFN- β ont une augmentation du SOCS-1 après chaque injection, du moins dans les lymphocytes T. Le SOCS-3 ne serait pas impliqué dans le mécanisme bénéfique de l'IFN- β sur les lymphocytes T. Ce point pourrait contribuer à expliquer l'efficacité partielle de l'IFN- β comme thérapie chez les patients atteints de la SEP. Une étude récente a démontré que l'augmentation à la fois des SOCS-1 et SOCS-3 chez des souris EAE est nécessaire pour la protection contre le microenvironnement pro-inflammatoire (Stark and Cross, 2006). En fait, deux modèles de souris ont été étudiés; des souris EAE ayant un profil génétique C57BL/6J qui manifestent la forme chronique de la maladie sans périodes de rémissions, et

des souris SJL mimant l'aspect cyclique de la SEP caractérisée par des crises et des rémissions totales, cette forme est la plus répandue chez les patients. Au pic de la maladie, les auteurs ont observé une majoration des taux de SOCS-1 et SOCS-3 (en ARNm) dans la moelle épinière, l'organe cible de cette maladie auto-immune, des souris SJL. Par contre, les souris C57BL/6J ont augmenté notablement leur niveau de SOCS-1, ce qui n'était pas le cas pour le SOCS-3. Les auteurs ont observé qu'une production inadéquate de SOCS-3 corrèle avec une quantité élevée de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-6) dans le SNC et un retard de l'expression des facteurs neuroprotecteurs tels que l'IL-10, le CNTF (*'Ciliary Neurotrophic Factor'*) et le FGF-2 (*'Fibroblast Growth Factor-2'*). Ces deux derniers sont associés à la remyélinisation. Ce qui explique l'amélioration et les rémissions spontanées chez les souris (SJL/J) qui ont augmenté les deux transcrits au niveau du SNC (Stark and Cross, 2006). Toutefois, ces données n'ont pas spécifié quel type cellulaire exprimait les SOCS. Nous pouvons spéculer à la lumière de ces données que les patients qui auraient des taux des SOCS-1 et SOCS-3 élevés après le traitement seraient probablement beaucoup mieux protégés contre une plus large variété de cytokines pro-inflammatoires. Probablement que l'IFN- β est apte à corriger une partie de l'altération en augmentant l'expression du SOCS-1, donc de fournir une protection partielle. D'ailleurs le bénéfice du traitement chez les patients est proche de 40 %. Suite à nos observations chez les donneurs sains, il serait très intéressant de comparer ces résultats chez les patients atteints de sclérose en plaques avec et sans traitement; nous pourrions mesurer les taux de SOCS dans leur sang périphérique ainsi que les différentes cytokines anti- et pro-inflammatoires. Une étude comparative pourrait aussi être accomplie en utilisant des échantillons de liquides céphalorachidiens (LCR), ce liquide biologique traduit ce qui se produit dans le SNC et pourrait ainsi fournir des informations sur les leucocytes présents dans l'organe cible.

2.0 L'IL-27 et l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T humains

L'IL-27, nouveau membre de la famille de l'IL-12, est un médiateur immunologique qui a une fonction paradoxale durant l'inflammation. Certaines études ont montré son rôle pro-inflammatoire en élucidant sa capacité à promouvoir la différenciation des lymphocytes T CD4 vers un profil de type Th1 (Lucas et al., 2003; Takeda et al., 2003; Owaki et al., 2005; Owaki et al., 2006a). Par contre, plusieurs autres études ont mis en évidence son empreinte protectrice et anti-inflammatoire. En fait, des souris déficientes de la chaîne WSX-1 du complexe IL-27R ('*IL-27 Receptor*') ont été utilisées comme modèles animaux d'auto-immunité et d'infection. Ces souris ont subi une aggravation pathologique à cause des réponses Th1 ou Th2 excessives (Villarino et al., 2003; Miyazaki et al., 2005; Rosas et al., 2006). Dans des modèles de souris EAE, l'IL-27 a prohibé la polarisation des cellules T CD4 en Th17 encéphalitogéniques et auto-agressives (Batten et al., 2006; Amadi-Obi et al., 2007). De plus, parmi ces effets bénéfiques, deux groupes ont démontré que l'IL-27 est capable d'empêcher une hyperactivation des lymphocytes T de souris en bloquant les voies de signalisation de l'IL-2. Ceci a été effectué entre autres via l'induction rapide du SOCS-3 (Owaki et al., 2006b; Yoshimura et al., 2006). Dans une étude toute récente (non publiée), les SOCS-1 et SOCS-3 ont été démontré comme de potentiels inhibiteurs du développement des Th17 au sein du système nerveux central, et ce en réponse à l'IL-27 (Qin et al., 2009). Très peu d'informations existent concernant l'effet anti-inflammatoire de l'IL-27 dans les cellules humaines et de sa probable coalition avec les protéines SOCS. Pour cela, nous voulions clarifier ce lien potentiel et particulièrement dans les lymphocytes T humains.

2.1 L'induction des SOCS-1 et SOCS-3 sélectivement dans les cellules T CD8.

Dans le but de mieux comprendre le profil temporel des SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à l'IL-27, nous avons établi une cinétique d'expression (Figure 14). Toutefois, jusqu'à maintenant aucune publication n'a révélé ce type de cinétique qui met en jeu l'IL-27 et les SOCS. Nous nous sommes basés sur une étude qui a montré une expression notable des SOCS-1 et SOCS-3 dans des monocytes humains. Ces cellules ont été stimulées pendant trois heures de temps avec 100 ng/ml (Kalliolias and Ivashkiv, 2008).

Nos lymphocytes T CD8 et CD4 purifiés ont été mis en culture avec la même dose d'IL-27 pendant une heure et trois heures. De manière intéressante, les deux sous-types lymphocytaires avaient un profil semblable avec un pic d'induction des deux transcrits SOCS après une heure et une rechute suite à trois heures de stimulation. Ceci est très similaire à la stimulation avec l'IFN- β où le temps optimal pour l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 était aussi après une heure. Malheureusement, aucune information n'est disponible au niveau de la littérature pour consolider nos résultats, toutefois nous avons eu recours aux profils de phosphorylation des STATs publiés qui pourraient bien refléter la cinétique des SOCS. La durée qui sépare la translocation des dimères STATs dans le noyau et l'initiation de la transcription des ARNm des SOCS correspondants est très minime. En fait, dans les lymphocytes T, l'IL-27 active les molécules JAK1, JAK2 et TYK2, qui à leur tour entraînent la phosphorylation de divers STATs soit STAT1, STAT3 STAT4 et STAT5. Les connaissances concernant l'importance de STAT4 et STAT5 dans la signalisation de l'IL-27 demeurent limitées (Paunovic et al., 2008). Donc, nous nous sommes particulièrement concentrés sur les molécules STAT1 et STAT3 puisqu'elles sont les mieux caractérisées chez l'humain, où leur phosphorylation a été démontrée dans les lymphocytes T CD4 naïfs, dans les monocytes, mastocytes et dans une lignée NK (NKL) (Hibbert et al., 2003; Pflanz et al., 2004). Les observations du groupe Kalliolias ainsi que des expériences effectuées dans notre laboratoire ont pu nous démontrer la validité de nos résultats. La phosphorylation des STAT1 et STAT3 a été induite par l'IL-27 dans des monocytes et des cellules mononucléaires humaines dans les 15 minutes qui suivent la stimulation avec un pic à 30 minutes, suivi d'un déclin progressif (Kalliolias and Ivashkiv, 2008) (Schneider et al., non publié). L'expression maximale des SOCS-1 et SOCS-3 que nous avons observée était après une heure de stimulation, ce qui suit temporellement le pic de phosphorylation des STATs. Ceci suggère que nos cinétiques d'expression des SOCS sont cohérentes en relation avec l'activation des STATs en réponse à l'IL-27. Si le pic d'expression des SOCS avait été enregistré avant ou après plusieurs heures suivant le pic de phosphorylation des STATs ceci mettrait en doute nos résultats relativement à ce qui a été publié. Suite à ces courtes expositions, nos observations nous ont permis de montrer que l'IL-27 pourrait avoir un effet anti-inflammatoire dans les cellules T humaines via l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau transcriptionnel.

A la lueur de ces informations, nous étions intéressés d'établir une dose-réponse des SOCS-1 et SOCS-3. Nous avons démontré plus tôt que les réponses à l'IFN- β variaient selon le sous-type lymphocytaire. Ceci suggérait qu'il était pertinent de comparer le comportement des lymphocytes T CD8 vs. CD4 suite à une exposition à l'IL-27 (Figure 15); nous avons discerné des différences non négligeables. Les lymphocytes T CD8 répondaient plus efficacement aux doses modérées de l'IL-27 (100 ng/ml) en augmentant significativement leur taux en ARNm des SOCS-1 et de SOCS-3. A des concentrations plus fortes (250 ng/ml), ces cellules étaient toujours sensibles à l'IL-27. Par contre les lymphocytes T CD4 ont montré une certaine résistance voire une indifférence face à des doses faibles et modérées d'IL-27. A fortes concentrations, les cellules T CD4 ont augmenté l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 sans toutefois atteindre les niveaux observés dans les lymphocytes T CD8. Ceci pourrait être dû à une différence d'expression de l'IL-27R à la surface de ces cellules. Rappelons que le complexe récepteur de l'IL-27 est formé de deux chaînes : gp130 qui est partagée avec les récepteurs de cytokines de la famille IL-6/IL-12, et la chaîne WSX-1 (ou TCCR) spécifique à l'IL-27 (Pflanz et al., 2004) . Toutefois, la WSX-1 n'est pas capable, à elle seule, de transduire le signal. Notre laboratoire s'intéresse à plusieurs cytokines ayant montré des effets au niveau de l'EAE et de la sclérose en plaques tel que l'IL-27 (Fitzgerald et al., 2007b; Wang et al., 2008). Une collègue (Teodora Yaneva) avait étudié l'expression *ex-vivo* du récepteur à l'IL-27 à la surface de plusieurs sous-types cellulaires de dix donneurs sains. Ses résultats peuvent expliquer la raison d'une meilleure réponse des lymphocytes T CD8 à l'IL-27 en terme d'induction des SOCS-1 et SOCS-3. Ses résultats avaient montré une proportion très élevée des monocytes ($75\% \pm 2,6\%$) qui co-exprimaient les deux chaînes du récepteur. Dans nos cellules d'intérêt, les lymphocytes T, la différence était majeure où une plus large population de cellules T CD8 ($6,6 \pm 0,1\%$) exprimaient le récepteur entier contre une faible proportion des cellules T CD4 ($0,9 \pm 1,0\%$) (Yaneva et al., 2008 non-publié). Ceci vient fortement appuyer la faible induction des SOCS-1 et SOCS-3 dans les cellules T CD4 suite à une stimulation avec l'IL-27.

Probablement que les SOCS-1 et SOCS-3 induits par l'IL-27 seraient impliqués davantage dans la régulation des fonctions cytolytiques des cellules T CD8. Toutefois, des résultats au sein de notre laboratoire ont dévoilé « la face » pro-inflammatoire de l'IL-27;

ainsi une stimulation des PBMC humains induisait une augmentation (dose-dépendente) de la prolifération cellulaire et de la production d'enzymes lytiques tel que le granzyme B et des cytokines inflammatoires comme l'IFN- γ par les lymphocytes T CD8 (Yaneva et al., non publié) ceci a aussi été démontré chez la souris (Morishima et al., 2005). Par contre dans une autre étude *in vitro*, il a été établi que l'ajout exogène d'IL-27 permettait aux lymphocytes T CD8 et CD4 murins exprimant IFN- γ et T-bet, d'augmenter leur production d'IL-10 (Fitzgerald et al., 2007b). Ainsi, ces dernières deviennent des cellules « auto-régulatrices », ce qui montre l'identité anti-inflammatoire de l'IL-27. De manière intéressante, deux groupes ont démontré que le SOCS-3 a été induit par l'IL-27 et a contribué à la suppression de l'IL-2 chez la souris (Owaki et al., 2006b; Villarino et al., 2006), d'autre part l'IL-10 a aussi été impliqué dans la suppression de l'IL-2 chez l'humain (Taga and Tosato, 1992). Prises ensemble, ces informations peuvent probablement indiquer que les SOCS et l'IL-10 peuvent être haussés en présence d'IL-27. De plus, ils peuvent travailler de concert pour fournir une protection et une capacité d'auto-régulation des cellules T, sans toutefois influencer directement les fonctions cytolytiques des lymphocytes T CD8. Il serait très captivant de mesurer d'une part, les taux des SOCS-1, SOCS-3 et d'IL-10 en réponse à l'IL-27 et d'autre part, de mesurer en parallèle le taux d'enzymes lytiques et des cytokines inflammatoires produites par les cellules T CD8 ou par les sous-populations Tc1/Tc2/Tc17. Concernant les sous-types lymphocytaires, il a été noté une réponse différentielle des cellules T CD8 naïves vs. mémoires envers l'IL-27 probablement dû à une expression distincte des molécules SOCS (Brender et al., 2007a) (Yaneva et al., non publié). Une comparaison des quantités de cellules T CD8+ SOCS1+/SOCS-3+ IL-10+ IFN- γ + dans les cellules traitées ou non avec l'IL-27 pourrait être aussi une bonne preuve de son effet anti-inflammatoire. Un blocage de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 pourrait permettre d'étudier leur importance dans la signalisation de l'IL-27. D'ailleurs cette technique permettant d'abolir l'expression des SOCS par les petits ARN interférants a déjà été effectuée avec succès dans une lignée de kératynocytes humains (HaCaT) et dans des cellules dendritiques (Song et al., 2006; Albanesi et al., 2007; Subramanya et al., 2009). Ceci serait très intéressant de le reproduire dans des cellules T humaines, ce qui n'a jamais été publié.

La dose-réponse établie nous a permis de prouver que l'IL-27 pourrait avoir des effets anti-inflammatoires en induisant les inhibiteurs SOCS-1 et SOCS-3 dans des cellules T humaines, particulièrement les cellules T CD8, sauf que ces importants mécanismes nécessitent encore un dénouement.

2.2 Les SOCS-1 et SOCS-3 également influencés par l'IL-27.

La courbe dose-réponse a élucidé le comportement des cellules T CD8 et CD4 quant à l'induction de chacun des SOCS-1 et SOCS-3 en ARNm. Toutefois, afin de quantifier en parallèle du nombre de copies codant pour les deux transcrits SOCS nous avons eu recours au calcul des $\Delta\Delta Ct$ obtenus par les cellules non traitées et celles qui ont été stimulées avec la plus haute dose (250 ng/ml). De manière intéressante, les SOCS-1 et SOCS-3 ont subi une induction quasiment identique dans chacun des sous types lymphocytaires (Figures 16 et 17). Dans les lymphocytes T CD8, SOCS-1 avait un $\Delta\Delta Ct = 2,35$ vs. 2,81 pour SOCS-3. Dans les cellules T CD4, SOCS-1 a marqué un $\Delta\Delta Ct = 1,25$ contre un $\Delta\Delta Ct = 0,93$ pour SOCS-3. Il semblerait que l'IL-27 a un impact égal quant à l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 au sein des mêmes cellules. Très peu d'études ont prospecté l'expression du SOCS-1 en réponse à l'IL-27, les informations publiées ont été plutôt concentrées sur l'induction du SOCS-3. En fait, il a été démontré qu'une déficience en SOCS-3 chez les souris a conduit à une dérégulation de la signalisation des cytokines qui se lie à la chaîne gp130, tel que l'IL-27 (Croker et al., 2003; Lang et al., 2003). Par contre, des souris déficientes en SOCS-1 présentaient des altérations de la signalisation des IFNs (Brysha et al., 2001). Pour cela les études regroupaient SOCS-1 et IFN vs. SOCS-3 et IL-27. Nous avons pu ajouter du nouveau sur les pistes d'études de l'IL-27 et particulièrement dans son rôle immunomodulateur et anti-inflammatoire. Mais, le plus important est que l'IL-27 a la même efficacité d'induction des SOCS-1 et de SOCS-3 pendant une exposition aigüe, ce qui rend les cellules moins susceptibles contre une plus large variété de cytokines pro-inflammatoires. Malgré le manque d'informations nous permettant de consolider nos résultats, nous considérons qu'il serait fort probable que les promoteurs des SOCS-1 et SOCS-3 partagent plusieurs régions communes réagissant de la même manière aux dimères STAT1-STAT3 en réponse à l'IL-27. Afin de localiser ces régions et d'étudier les séquences communes, il serait intéressant de construire des

promoteurs complets des SOCS-1 et de SOCS-3 ainsi que des mutants ayant subi des délétions uniques ou multiples de plusieurs régions. Ces derniers seraient introduits dans nos lymphocytes T par transfection puis stimulés avec l'IL-27, ce qui n'a jamais été reproduit. Cette technique a déjà été utilisée dans une lignée d'astrocytes murins pour étudier l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 en réponse à l'IFN- β . Ce groupe a mis en évidence plusieurs séquences GAS au sein de ces promoteurs qui répondent avec la même efficacité à l'IFN- β , en induisant des taux équivalents des SOCS-1 et SOCS-3 (en ARNm) (Qin et al., 2008).

3.0 L'efficacité équivalente de l'IFN- β et l'IL-27 dans les cellules T CD8

Nous avons démontré que l'IL-27 a agi avec une efficacité très équivalente sur les SOCS-1 et SOCS-3 dans un même type cellulaire (à la plus haute dose) (Figures 16 et 17). Quant à l'IFN- β (discuté plus tôt, section 1.1.2, p.92), dans les lymphocytes T CD8, le SOCS-1 a atteint un $\Delta\Delta\text{Ct} = 2,52$ contre 2,56 pour le SOCS-3. Les lymphocytes T CD4 exprimaient aussi des taux équivalents des deux transcrits 2,28 (SOCS-1) vs. 2,13 (SOCS-3). Nous remarquons qu'une exposition aiguë à l'IL-27 ou l'IFN- β entraîne le même impact quant à l'induction des SOCS-1 et SOCS-3 et ce, spécifiquement sur les lymphocytes T CD8, ce qui n'a pas été publié jusqu'à maintenant. Ceci montre l'existence probable d'une redondance entre certaines fonctions immunomodulatrices de l'IL-27 et l'IFN- β . Bien qu'elles activent des voies de signalisation différentes, leurs effets peuvent se chevaucher au niveau de certains points. Il semble que l'IFN- β et l'IL-27 interagissent de façon beaucoup plus étroite que ce qui a été relevé dans la littérature. En fait, la thérapie actuelle de la sclérose en plaques, soit l'IFN- β augmente l'expression de l'IL-27 aussi bien au niveau de l'ARNm (Remoli et al., 2007) qu'au niveau protéique (Fitzgerald and Rostami, 2009). Cet axe IFN- β -IL-27 joue un rôle crucial et pivot dans le contrôle de l'inflammation au sein du système nerveux central. Très récemment, deux groupes de chercheurs ont découvert des capacités immunorégulatrices-clés de l'IL-27 pendant la maladie de l'EAE et sa forte coalition avec l'IFN- β . Le groupe de Guo et collègues a démontré que l'IL-27 est un produit direct de la cascade de signalisation déclenchée par l'IFN- β , de plus qu'il a la capacité de limiter l'inflammation dans des modèles EAE. En fait dans la présente étude, les souris déficientes en IFNAR (*IFNAR*^{-/-}), récepteur de l'IFN- β , exhibent des symptômes pathologiques plus prononcés. De manière très intéressante, l'état général des souris s'est bien amélioré suite à l'administration exogène de l'IL-27 (Guo et al., 2008). Ici l'IL-27 a probablement rempli en partie la fonction de l'IFN- β . Le second groupe, Shinohara et collègues, a aussi démontré l'efficacité de l'IL-27 à contraindre et à freiner l'inflammation et l'autoimmunité exagérées au niveau du système nerveux central. Toutefois ces chercheurs ont élucidé un mécanisme d'action tout nouveau impliqué dans la cascade de l'IFN- β . En fait, un isoforme intracellulaire de l'ostéopontine, Opn-I, est capable de réprimer l'expression de l'IL-27, sauf que la voie de signalisation des IFN de type I bloque l'activité de l'Opn-I, soutenant ainsi l'expression de l'IL-27. Ce processus conduit alors à la

suppression subséquente de l'EAE (Shinohara et al., 2008). Ces deux expériences avaient montré une interdépendance et une redondance très parlantes entre l'IFN- β et l'IL-27, ce qui appuie fortement les résultats que nous avons obtenus. Ceci pourrait expliquer l'équivalence d'induction des SOCS-1 et SOCS-3 avec l'une ou l'autre des cytokines (Figures 8-9 et 16-17) dans les cellules T CD8.

Par contre, dans les lymphocytes T CD4 la réponse à l'IL-27 était moins considérable tenant compte du faible nombre de récepteurs IL-27R (discuté à la section 2.2.1, p.103) (Yaneva et al., non publié). Il serait intéressant de comparer le nombre de récepteurs à l'IL-27 chez les patients atteints de la SEP et les sujets témoins. La cascade de signalisation enclenchée par l'IL-27 semble être une cible clé; pourrait-elle contribuer à l'amélioration de l'effet thérapeutique de l'IFN- β chez les patients atteints de la SEP?

4.0 Expression protéique des SOCS-1 et SOCS-3

Au niveau de nos expériences décrites plus tôt, nous nous sommes concentrés sur l'effet direct de l'IFN- β et l'IL-27 sur l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau de l'ARNm, ce qui est le plus fréquent dans la littérature. Très peu d'études ont présenté des données montrant l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 au niveau protéique. La mesure des ARNm nous a renseigné sur la dynamique de l'expression génique et nous a permis de prédire le comportement de la cellule, pourtant ce sont les protéines qui reflètent ce qui se passe réellement. Pour cela, nous voulions détecter les protéines SOCS-1 et SOCS-3 afin d'augmenter la solidité et la pertinence de nos résultats. Malgré la limitation des informations à ce niveau, nous avons trouvé certaines études qui ont pu visualiser nos protéines d'intérêt, dont celle qui a détecté les SOCS-1 et SOCS-3 dans une lignée d'astrocytes en réponse à l'IFN- β et ce, par la technique d'immunoblot précédée d'une étape d'immunoprécipitation. Les cellules ont été stimulées de 30 minutes à 24 heures et ont marqué un pic d'expression entre trois et quatre heures (Qin et al., 2008). A la lumière de ces données nous avons essayé de reproduire le même principe sur nos cellules T purifiées et stimulées avec l'IFN- β ou l'IL-27 (pendant trois heures de temps). Nous avons utilisé la technique d'immuno-buvardage (*Western blot*) qui est très similaire à l'immunoblot, par contre l'étape d'immunoprécipitation n'a pas été incluse. Malheureusement, nous n'avons pas pu détecter les protéines SOCS ni dans les cellules T et ni dans les cellules dendritiques (CD). Pourtant, ces dernières (les CD) formaient notre gabarit et avaient un taux d'expression élevé en ARNm. L'expérience n'avait pas non plus réussi dans des lignées cellulaires épithéliales humaines telles les A549, qui avaient montré une induction de SOCS-1 suite à une stimulation à l'IL-3 et l'IL-14 (Hebenstreit et al., 2003). Suite à plusieurs tentatives d'optimisation telles que l'utilisation de différents tampons de lyse, modification des clones d'anticorps primaires (anti-SOCS), augmentation de la sensibilité des méthodes de détection par chimioluminescence (ECL et ECL plus), nous n'avons pas visualisé de bande sur nos gels, malgré de très beaux signaux pour le témoin positif (actine). A cause de ces complications techniques, nous avons opté pour une seconde méthode de détection soit l'immunocytochimie. Le groupe de Isomaki et collègues avait réussi à détecter à la fois les SOCS-1 et SOCS-3 dans des tissus synoviaux humains (Isomaki et al., 2007). Nous avons alors suivi la même procédure (avec certaines

optimisations) et nous sommes parvenus à visualiser nos protéines dans les cellules T humaines contrôles et stimulées avec l'IFN- β ou l'IL-27. Ceci est tout nouveau puisqu'il n'a jamais été reproduit auparavant.

On remarque dans nos résultats que près de 35% à 50% des lymphocytes T CD8 et CD4 non traités expriment les SOCS-1 et SOCS-3 respectivement. La stimulation avec l'IFN- β et l'IL-27 a notablement augmenté le nombre de cellules positives pour s'échelonner entre 70% et 90% pour les SOCS-1 et SOCS-3 dans les deux types cellulaires (Figure 20) (expression plus faible dans les T CD4 que les CD8). Le comptage des cellules exprimant chacun des SOCS dans cinq champs différents nous a donné une bonne estimation quant à l'effet de la stimulation (voir les photos de microscopie figures 18, 19) Ceci vient renforcer les résultats que nous avons obtenus en ARNm et montre que les deux cytokines ont profondément influencé les cellules en induisant la traduction des transcrits. Très récemment dans notre laboratoire, un collègue a pu optimiser une procédure permettant de détecter les protéines SOCS (et STATs) dans des PBMC et ce, par cytométrie en flux (Schneider et al. non publié) (voir annexe). Cette technique semble être très prometteuse pour visualiser nos protéines, nous aurons la possibilité d'étudier plusieurs paramètres de façon concomitante; ce qui est un avantage par rapport à la microscopie. Il serait intéressant de reproduire nos expériences précédentes en utilisant la cytométrie en flux en observant l'expression des SOCS dans des différentes sous-types cellulaires (mémoires vs. naïves) (Th1/Th2/Th17, Tc1/Tc2/Tc17). Nous pourrions aussi visualiser les niveaux protéiques lors d'exposition répétées à l'IFN- β et l'IL-27. De plus il serait pertinent d'élucider les voies STAT-SOCS induites suite aux stimulations, ainsi que la quantification des récepteurs IFNAR et IL-27R à la surface des différents types de cellules immunitaires. Nous pourrions aussi comparer les niveaux des SOCS chez les sujets témoins et les patients atteints de SEP selon les types cellulaires, ce qui aura une haute importance clinique.

Notons que dans le but d'atteindre une meilleure validité scientifique, il serait intéressant de reproduire nos expériences au niveau de l'ARNm et protéique, de sorte d'accumuler les données d'au moins dix donneurs sains. Ceci augmentera davantage la rigueur et la pertinence de nos résultats

CONCLUSION/ FUTURES PERSPECTIVES

Les membres de la famille des protéines SOCS sont des composants intracellulaires émergents, marquant une implication accrue dans les mécanismes d'immunorégulation (Dimitriou et al., 2008). Les protéines SOCS ne sont pas uniquement des régulateurs négatifs des cascades de signalisation, mais sont responsables d'orchestrer tout un réseau complexe de signaux au sein de la cellule (Yoshimura et al., 2007). Les protéines SOCS-1 et SOCS-3 sont les mieux caractérisées et sont considérées comme des régulateurs physiologiques clés au niveau de l'immunité innée et acquise. D'autre part des cytokines tels que l'IFN- β , thérapie actuelle de la sclérose en plaques, et l'IL-27 semblent jouer un rôle important dans la diminution de la susceptibilité des cellules au microenvironnement pro-inflammatoire. Certaines études ont démontré une probable alliance mettant en jeu l'IFN- β / l'IL-27 et les protéines SOCS-1 et SOCS-3. Toutefois, très peu d'informations sont disponibles chez l'humain. Nous avons réussi à démontrer que l'IFN- β a la capacité d'induire à la fois les SOCS-1 et SOCS-3 dans les lymphocytes T CD8 et CD4 humains. De plus, leur niveau d'induction était très comparable montrant l'efficacité équivalente de l'IFN- β sur les deux transcrits SOCS. Il serait très captivant de démontrer l'effet de l'IFN- β dans les différents sous-types cellulaires dépendamment de leur polarisation et de leur phénotype. En parallèle la quantification des récepteurs à l'IFN- β pourrait élucider les cellules moins affectées par la présente cytokine. Nous avons tenté de mimer ce qui se produit chez les patients atteints de la SEP qui sont sous traitement et ce, particulièrement au niveau des lymphocytes T. Une administration chronique de l'IFN- β aux cellules, a révélé une composante importante de son mécanisme d'action soit l'induction répétée du SOCS-1. L'induction du SOCS-1 pourrait avoir une valeur clinique puissante, permettant aux cellules T de limiter leur sensibilité aux diverses cytokines pro-inflammatoires. Ceci n'a jamais été publié. Toutefois nous nous questionnons sur l'incapacité de l'IFN- β à induire le SOCS-3 chroniquement, est-elle une des faiblesses du traitement? En ciblant le SOCS-3, pourrait-on augmenter les bénéfices de l'IFN- β et ce, en bloquant une série de signalisation plus diversifiées s'avérant très néfastes? Le SOCS-3 semble être une cible thérapeutique très intéressante. Selon la littérature, le SOCS-3 pourrait être induit préférentiellement par certains types de cytokines. En fait, une déficience en SOCS-3 chez les souris a conduit à une dérégulation de la signalisation des cytokines qui se lie à la chaîne commune gp130, telle que l'IL-27 (Croker et al., 2003; Lang et al., 2003). Nos résultats avec l'IL-27 ont montré une induction égale des SOCS-1 et SOCS-3 dans les

cellules T, mais nous avons noté une augmentation moins prononcée dans les lymphocytes T CD4, faute de récepteurs à l'IL-27. Il aurait été très intéressant d'effectuer une exposition chronique des cellules T à l'IL-27 et d'observer si le SOCS-3 serait induit après chaque stimulation. Si c'est le cas, peut-on parler de combinaison thérapeutique IL-27/IFN- β ? En fait, l'IL-27 est un produit direct de la cascade de signalisation déclenchée par l'IFN- β . De plus, ces deux cytokines semblent avoir des fonctions chevauchantes et complémentaires surtout dans l'amélioration de la sévérité de l'EAE (Guo et al., 2008; Shinohara et al., 2008). D'ailleurs nous avons démontré (en calculant les $\Delta\Delta Ct$), que les deux cytokines induisent les mêmes taux des SOCS-1 et SOCS-3 suite à une exposition aiguë. Une stimulation simultanée avec les deux cytokines (aiguë vs. chronique) pourrait aussi dévoiler de nouveaux effets quant à l'induction des SOCS-1 et SOCS-3. Il est probable que les cellules seraient plus résistantes dans un environnement pro-inflammatoire tel que dans le système nerveux central inflammé des patients atteints de la SEP. Nos résultats au niveau protéique par immunocytochimie ont pu consolider les observations au niveau de l'ARNm. Toutefois vu les limitations de la microscopie, il serait intéressant de pouvoir opter pour la technique de cytométrie de flux, surtout que nous avons optimisé la procédure pour la détection des SOCS/STAT (Schneider et al. non publié). Plusieurs paramètres peuvent être étudiés en même temps, le plus important serait d'abord de mieux élucider toutes les voies STAT-SOCS empruntées par nos deux cytokines d'intérêt, puisque ces informations sont limitées au niveau de la littérature. Il est très intéressant que ces expériences soient effectuées dans divers types cellulaires du système immunitaire. Donc à la première étape, la régulation positive des SOCS-1 et SOCS-3 par l'IFN- β et l'IL-27 nécessitent encore des expériences supplémentaires. En second lieu, il serait très avantageux de bloquer l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 et de mesurer la susceptibilité des cellules aux diverses cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF etc.). Nous pourrions étudier leur prolifération, la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que les granzymes et la perforine, l'expression de diverses molécules d'adhésion suspectes telles que MCAM (*'Melanoma Cell Adhesion Molecule'*) et ALCAM (*'Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule'*) (Cayrol et al., 2008). Une étude comparative entre les sujets sains et les patients atteints de la SEP sera indispensable. Nous pourrions mesurer les niveaux des SOCS-1 et SOCS-3 chez ces deux groupes. De plus, il est intéressant de pouvoir diviser le groupe des patients atteints de la SEP en sous-catégories : les patients non traités (nouvellement

diagnostiqués) et les patients suivant régulièrement le traitement à base d'IFN- β . En parallèle, l'étude de l'expression de l'IL-27 et des récepteurs s'avère nécessaire. De manière intéressante, nous pourrions traiter les cellules de patients avec l'IL-27 et observer les effets subséquents quant à l'expression des SOCS-1 et SOCS-3 et à la sécrétion de l'IL-10, ce qui a été produit chez les souris EAE. Une analyse de l'expression des SOCS-1 et SOCS-3, en réponse à l'IFN- β et l'IL-27, dans les sous-populations de cellules T CD4 et CD8 (naïves, effectrices, mémoires, centrales mémoires etc.) serait importante autant chez les donneurs sains que les patients SEP.

BIBLIOGRAPHIE

- (1998) Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet* 352:1498-1504.
- Aaronson DS, Horvath CM (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653-1655.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007) Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-949.
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM (2002) T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* 3:549-557.
- Ahmed CM, Dabelic R, Waiboci LW, Jager LD, Heron LL, Johnson HM (2009) SOCS-1 mimetics protect mice against lethal poxvirus infection: identification of a novel endogenous antiviral system. *J Virol* 83:1402-1415.
- Akira S (1999) Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17:138-146.
- Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, Scarponi C, De Pita O, Leung DY, Howell MD (2007) IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* 179:984-992.
- Alexander WS (2002) Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:410-416.
- Alexander WS, Hilton DJ (2004) The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 22:503-529.
- Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW, Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ (1999) SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 98:597-608.
- Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, Cubillas-Tejeda AC, Gonzalez-Amaro R (2006) Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 27:110-118.
- Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, Gery I, Lee YS, Egwuagu CE (2007) TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13:711-718.
- Andre S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J (2009) Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol* 174:1575-1587.
- Arduini RM, Strauch KL, Runkel LA, Carlson MM, Hronowski X, Foley SF, Young CN, Cheng W, Hochman PS, Baker DP (1999) Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon-beta-1a and its receptor chains. *Protein Sci* 8:1867-1877.
- Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C (1993) Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74:237-244.

- Arnaud P (2002) [The interferons: pharmacology, mechanism of action, tolerance and side effects]. *Rev Med Interne* 23 Suppl 4:449s-458s.
- Artis D, Johnson LM, Joyce K, Saris C, Villarino A, Hunter CA, Scott P (2004) Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172:4672-4675.
- Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A (2009) The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev* 228:41-57.
- Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL (2007) A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 8:1380-1389.
- Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Bioley G, Valmori D (2009) Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8635-8640.
- Babon JJ, McManus EJ, Yao S, DeSouza DP, Mielke LA, Sprigg NS, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M, Nicholson SE, Norton RS (2006) The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Mol Cell* 22:205-216.
- Baerwald KD, Popko B (1998) Developing and mature oligodendrocytes respond differently to the immune cytokine interferon-gamma. *J Neurosci Res* 52:230-239.
- Balabanov R, Strand K, Kemper A, Lee JY, Popko B (2006) Suppressor of cytokine signaling 1 expression protects oligodendrocytes from the deleterious effects of interferon-gamma. *J Neurosci* 26:5143-5152.
- Balabanov R, Strand K, Goswami R, McMahan E, Begolka W, Miller SD, Popko B (2007) Interferon-gamma-oligodendrocyte interactions in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 27:2013-2024.
- Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA (1999) Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 100:252-259.
- Barber EK, Dasgupta JD, Schlossman SF, Trevillyan JM, Rudd CE (1989) The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3277-3281.
- Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N (2006) Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7:929-936.
- Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7:904-912.
- Bermel RA, Rudick RA (2007) Interferon-beta treatment for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 4:633-646.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
- Betts RJ, Kemeny DM (2009) CD8+ T cells in asthma: friend or foe? *Pharmacol Ther* 121:123-131.
- Biron CA (1998) Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol* 10:383-390.

- Biron CA, Cousens LP, Ruzek MC, Su HC, Salazar-Mather TP (1998) Early cytokine responses to viral infections and their roles in shaping endogenous cellular immunity. *Adv Exp Med Biol* 452:143-149.
- Bisbal C (2008) [Self RNA cleavage by RNase L amplifies antiviral innate immunity]. *Med Sci (Paris)* 24:23-25.
- Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC (2005) TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺Tregs. *J Clin Invest* 115:2904-2913.
- Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ (2007) Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol* 19:339-347.
- Brender C, Nielsen M, Ropke C, Nissen MH, Svejgaard A, Billestrup N, Geisler C, Odum N (2001) Interferon-alpha induces transient suppressors of cytokine signalling expression in human T cells. *Exp Clin Immunogenet* 18:80-85.
- Brender C, Tannahill GM, Jenkins BJ, Fletcher J, Columbus R, Saris CJ, Ernst M, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS, Starr R (2007a) SOCS3 regulates CD8 T cell proliferation by inhibition of IL-6 and IL-27. *Blood*.
- Brender C, Tannahill GM, Jenkins BJ, Fletcher J, Columbus R, Saris CJ, Ernst M, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS, Starr R (2007b) Suppressor of cytokine signaling 3 regulates CD8 T-cell proliferation by inhibition of interleukins 6 and 27. *Blood* 110:2528-2536.
- Brierley MM, Fish EN (2005) Stats: multifaceted regulators of transcription. *J Interferon Cytokine Res* 25:733-744.
- Briscoe J, Kohlhuber F, Muller M (1996) JAKs and STATs branch out. *Trends Cell Biol* 6:336-340.
- Brysha M, Zhang JG, Bertolino P, Corbin JE, Alexander WS, Nicola NA, Hilton DJ, Starr R (2001) Suppressor of cytokine signaling-1 attenuates the duration of interferon gamma signal transduction in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276:22086-22089.
- Buckley RH (2004) Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu Rev Immunol* 22:625-655.
- Bullen DV, Darwiche R, Metcalf D, Handman E, Alexander WS (2001) Neutralization of interferon-gamma in neonatal SOCS1^{-/-} mice prevents fatty degeneration of the liver but not subsequent fatal inflammatory disease. *Immunology* 104:92-98.
- Bullen DV, Hansen DS, Siomos MA, Schofield L, Alexander WS, Handman E (2003) The lack of suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1) protects mice from the development of cerebral malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA. *Parasite Immunol* 25:113-118.
- Bullock AN, Debreczeni JE, Edwards AM, Sundstrom M, Knapp S (2006) Crystal structure of the SOCS2-elongin C-elongin B complex defines a prototypical SOCS box ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7637-7642.
- Bullock AN, Rodriguez MC, Debreczeni JE, Songyang Z, Knapp S (2007) Structure of the SOCS4-ElonginB/C complex reveals a distinct SOCS box interface and the molecular basis for SOCS-dependent EGFR degradation. *Structure* 15:1493-1504.
- Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A (2003) STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 197:157-168.
- Catlett IM, Hedrick SM (2005) Suppressor of cytokine signaling 1 is required for the differentiation of CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 6:715-721.
- Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, Haqqani AS, Kreyenborg K, Krug S, Moudjian R, Bouthillier A, Becher B, Arbour N, David S,

- Stanimirovic D, Prat A (2008) Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 9:137-145.
- Cerwenka A, Morgan TM, Harmsen AG, Dutton RW (1999) Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. *J Exp Med* 189:423-434.
- Cerwenka A, Carter LL, Reome JB, Swain SL, Dutton RW (1998) In vivo persistence of CD8 polarized T cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines. *J Immunol* 161:97-105.
- Chen J, Baig E, Fish EN (2004a) Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* 24:687-698.
- Chen L (2004) Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4:336-347.
- Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A, Grewal IS, de Sauvage FJ (2000) Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407:916-920.
- Chen W, Khurana Hershey GK (2007) Signal transducer and activator of transcription signals in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 119:529-541; quiz 542-523.
- Chen W, Daines MO, Khurana Hershey GK (2004b) Turning off signal transducer and activator of transcription (STAT): the negative regulation of STAT signaling. *J Allergy Clin Immunol* 114:476-489; quiz 490.
- Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L, O'Shea JJ (2006) Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8137-8142.
- Chofflon M (2005) Mechanisms of action for treatments in multiple sclerosis: Does a heterogeneous disease demand a multi-targeted therapeutic approach? *BioDrugs* 19:299-308.
- Chong MM, Cornish AL, Darwiche R, Stanley EG, Purton JF, Godfrey DI, Hilton DJ, Starr R, Alexander WS, Kay TW (2003) Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8+ T cell differentiation. *Immunity* 18:475-487.
- Choudhuri K, van der Merwe PA (2007) Molecular mechanisms involved in T cell receptor triggering. *Semin Immunol* 19:255-261.
- Clemens MJ (1997) PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* 29:945-949.
- Coccia EM (2008) IFN regulation and functions in myeloid dendritic cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:21-32.
- Cohney SJ, Sanden D, Cacalano NA, Yoshimura A, Mui A, Migone TS, Johnston JA (1999) SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol Cell Biol* 19:4980-4988.
- Cooney RN (2002) Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 17:83-90.
- Crespo A, Filla MB, Russell SW, Murphy WJ (2000) Indirect induction of suppressor of cytokine signalling-1 in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide: partial role of autocrine/paracrine interferon-alpha/beta. *Biochem J* 349:99-104.
- Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW (1994) Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 180:1715-1728.

- Crocker BA, Kiu H, Nicholson SE (2008) SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19:414-422.
- Crocker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Forster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS (2003) SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 4:540-545.
- Crocker BA, Metcalf D, Robb L, Wei W, Mifsud S, DiRago L, Cluse LA, Sutherland KD, Hartley L, Williams E, Zhang JG, Hilton DJ, Nicola NA, Alexander WS, Roberts AW (2004) SOCS3 is a critical physiological negative regulator of G-CSF signaling and emergency granulopoiesis. *Immunity* 20:153-165.
- Cross A, Lyons JA, Stark J, Ramsbottom M, Rapp N (2005) Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are decreased in multiple sclerosis patients. Abstract 21st Congress of the European Committee for the Treatment and Research in Multiple Sclerosis and 10th Annual Meeting of the Americas Committee for the Treatment and Research in Multiple Sclerosis.
- Curtiss FR (2007) Pharmacoeconomic modeling of drug therapies for multiple sclerosis--are we building houses on sand? *J Manag Care Pharm* 13:287-289.
- Dalpke A, Heeg K (2003) Suppressors of cytokine signaling proteins in innate and adaptive immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 51:91-103.
- Darnell JE, Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421.
- Davey GM, Starr R, Cornish AL, Burghardt JT, Alexander WS, Carbone FR, Surh CD, Heath WR (2005) SOCS-1 regulates IL-15-driven homeostatic proliferation of antigen-naive CD8 T cells, limiting their autoimmune potential. *J Exp Med* 202:1099-1108.
- Davis MM (2002) A new trigger for T cells. *Cell* 110:285-287.
- de Zoeten EF, Hancock WW (2008) Strategies to cure experimental autoimmune colitis using antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *Gastroenterology* 134:2171-2174.
- Decker T, Muller M, Stockinger S (2005) The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 5:675-687.
- Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, Birkenbach M (1996) A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* 70:1143-1153.
- Dimitriou ID, Clemenza L, Scotter AJ, Chen G, Guerra FM, Rottapel R (2008) Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol Rev* 224:265-283.
- Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, Chen Y, Tato CM, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Hunter CA, Cua DJ, Kastelein RA (2009) IL-27 blocks ROR γ c expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol* 182:5748-5756.
- Dupont SA, Goelz S, Goyal J, Green M (2002) Mechanisms for regulation of cellular responsiveness to human IFN- β 1a. *J Interferon Cytokine Res* 22:491-501.
- Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland SM, Schreiber RD, Casanova JL (2001) Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 293:300-303.
- Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chappier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Al-

- Gazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL (2003) Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 33:388-391.
- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84:443-450.
- Durelli L, Bongioanni MR, Ferrero B, Oggero A, Marzano A, Rizzetto M (1998) Interferon treatment for multiple sclerosis: autoimmune complications may be lethal. *Neurology* 50:570-571.
- Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, Ferrero B, Eid P, Novelli F (2009) T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol* 65:499-509.
- Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M, Mahdi RM, Kim SJ, Gery I (2002) Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 168:3181-3187.
- Egwuagu CE, Yu CH, Mahdi RM, Mameza M, Eseonu C, Takase H, Ebong S (2006) Cytokine-induced retinal degeneration: role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in protection of the neuroretina. *Adv Exp Med Biol* 572:275-281.
- El Kasmi KC, Holst J, Coffre M, Mielke L, de Pauw A, Lhocine N, Smith AM, Rutschman R, Kaushal D, Shen Y, Suda T, Donnelly RP, Myers MG, Jr., Alexander W, Vignali DA, Watowich SS, Ernst M, Hilton DJ, Murray PJ (2006) General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol* 177:7880-7888.
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921-924.
- Eriksen KW, Lovato P, Skov L, Krejsgaard T, Kaltroft K, Geisler C, Odum N (2005) Increased sensitivity to interferon-alpha in psoriatic T cells. *J Invest Dermatol* 125:936-944.
- Espert L, Gongora C, Mechti N (2003) [Interferon : antiviral mechanisms and viral escape]. *Bull Cancer* 90:131-141.
- Feldman GM, Rosenthal LA, Liu X, Hayes MP, Wynshaw-Boris A, Leonard WJ, Hennighausen L, Finbloom DS (1997) STAT5A-deficient mice demonstrate a defect in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation and gene expression. *Blood* 90:1768-1776.
- Fenner JE, Starr R, Cornish AL, Zhang JG, Metcalf D, Schreiber RD, Sheehan K, Hilton DJ, Alexander WS, Hertzog PJ (2006) Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. *Nat Immunol* 7:33-39.
- Fensterl V, Sen GC (2009) Interferons and viral infections. *Biofactors* 35:14-20.
- Fitzgerald DC, Rostami A (2009) Therapeutic potential of IL-27 in multiple sclerosis? *Expert Opin Biol Ther* 9:149-160.
- Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, Gran B, Zhang GX, Rostami A (2007a) Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:3268-3275.
- Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, Saris CJ, Gran B, Ciric B, Rostami A (2007b) Suppression of autoimmune inflammation of the central

- nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 8:1372-1379.
- Flowers LO, Johnson HM, Mujtaba MG, Ellis MR, Haider SM, Subramaniam PS (2004) Characterization of a peptide inhibitor of Janus kinase 2 that mimics suppressor of cytokine signaling 1 function. *J Immunol* 172:7510-7518.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
- Francis GS, Grumser Y, Alteri E, Micaleff A, O'Brien F, Alsop J, Stam Moraga M, Kaplowitz N (2003) Hepatic reactions during treatment of multiple sclerosis with interferon-beta-1a: incidence and clinical significance. *Drug Saf* 26:815-827.
- Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A (1991) Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251:313-316.
- Frisullo G, Angelucci F, Caggiula M, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Sancricca C, Mirabella M, Tonali PA, Batocchi AP (2006) pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. *J Neurosci Res* 84:1027-1036.
- Fu XY, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnell JE, Jr. (1990) ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8555-8559.
- Fujimoto M, Tsutsui H, Yumikura-Futatsugi S, Ueda H, Xingshou O, Abe T, Kawase I, Nakanishi K, Kishimoto T, Naka T (2002) A regulatory role for suppressor of cytokine signaling-1 in T(h) polarization in vivo. *Int Immunol* 14:1343-1350.
- Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD (2003) Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15:430-435.
- Gao GF, Jakobsen BK (2000) Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today* 21:630-636.
- Garcia KC, Teyton L, Wilson IA (1999) Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17:369-397.
- Gauzzi MC, Velazquez L, McKendry R, Mogensen KE, Fellous M, Pellegrini S (1996) Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem* 271:20494-20500.
- Ghaffar O, Christodouloupoulos P, Lamkhioued B, Wright E, Ihaku D, Nakamura Y, Frenkiel S, Hamid Q (2000) In vivo expression of signal transducer and activator of transcription factor 6 (STAT6) in nasal mucosa from atopic allergic rhinitis: effect of topical corticosteroids. *Clin Exp Allergy* 30:86-93.
- Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ (2009) Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev* 228:273-287.
- Gil J, Esteban M (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5:107-114.
- Gisselbrecht S (1999) The CIS/SOCS proteins: a family of cytokine-inducible regulators of signaling. *Eur Cytokine Netw* 10:463-470.
- Goldberg R, Wildbaum G, Zohar Y, Maor G, Karin N (2004a) Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* 173:1171-1178.

- Goldberg R, Zohar Y, Wildbaum G, Geron Y, Maor G, Karin N (2004b) Suppression of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* 173:6465-6471.
- Goodin DS (2005) Treatment of multiple sclerosis with human beta interferon. *Int MS J* 12:96-108.
- Gu X, Lundqvist EN, Coates PJ, Thurffjell N, Wettersand E, Nylander K (2006) Dysregulation of TAp63 mRNA and protein levels in psoriasis. *J Invest Dermatol* 126:137-141.
- Guo B, Chang EY, Cheng G (2008) The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* 118:1680-1690.
- Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I (2006) Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol* 72:1538-1546.
- Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, Cooper AM, Swain SL, Dutton RW (2009) Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* 182:3469-3481.
- Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H (2003) WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19:657-667.
- Hanada T, Yoshida H, Kato S, Tanaka K, Masutani K, Tsukada J, Nomura Y, Mimata H, Kubo M, Yoshimura A (2003) Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity* 19:437-450.
- Hansen JA, Lindberg K, Hilton DJ, Nielsen JH, Billestrup N (1999) Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol Endocrinol* 13:1832-1843.
- Hansen JD, Strassburger P (2000) Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8 alpha, in rainbow trout. *J Immunol* 164:3132-3139.
- Haspel RL, Darnell JE, Jr. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10188-10193.
- Hebenstreit D, Luft P, Schmiedlechner A, Duschl A, Horejs-Hoeck J (2005) SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IL-4 and IL-13 induced activation of Eotaxin-3/CCL26 gene expression in HEK293 cells. *Mol Immunol* 42:295-303.
- Hebenstreit D, Luft P, Schmiedlechner A, Regl G, Frischauf AM, Aberger F, Duschl A, Horejs-Hoeck J (2003) IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site. *J Immunol* 171:5901-5907.
- Heinonen KM, Bourdeau A, Doody KM, Tremblay ML (2009) Protein tyrosine phosphatases PTP-1B and TC-PTP play nonredundant roles in macrophage development and IFN-gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9368-9372.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2):297-314.
- Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA (2003) IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 23:513-522.
- Hilton DJ (1999) Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 55:1568-1577.

- Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41:2502-2512.
- Hofstetter H, Gold R, Hartung HP (2009) Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int MS J* 16:12-18.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Horvath CM (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* 25:496-502.
- Hovanessian AG, Justesen J (2007) The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie* 89:779-788.
- Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS (2004) Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10:734-738.
- Hoyer KK, Kuswanto WF, Gallo E, Abbas AK (2009) Distinct roles of helper T-cell subsets in a systemic autoimmune disease. *Blood* 113:389-395.
- Huising MO, Kruiswijk CP, Flik G (2006) Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *J Endocrinol* 189:1-25.
- Hwang MN, Min CH, Kim HS, Lee H, Yoon KA, Park SY, Lee ES, Yoon S (2007) The nuclear localization of SOCS6 requires the N-terminal region and negatively regulates Stat3 protein levels. *Biochem Biophys Res Commun* 360:333-338.
- Ilangumaran S, Ramanathan S, Rottapel R (2004) Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. *Semin Immunol* 16:351-365.
- Ilangumaran S, Ramanathan S, La Rose J, Poussier P, Rottapel R (2003) Suppressor of cytokine signaling 1 regulates IL-15 receptor signaling in CD8⁺CD44^{high} memory T lymphocytes. *J Immunol* 171:2435-2445.
- Imada K, Leonard WJ (2000) The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 37:1-11.
- Ingle E, Klinken SP (2006) Cross-regulation of JAK and Src kinases. *Growth Factors* 24:89-95.
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409:349-354.
- Isomaki P, Alanara T, Isohanni P, Lagerstedt A, Korpela M, Moilanen T, Visakorpi T, Silvennoinen O (2007) The expression of SOCS is altered in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 46:1538-1546.
- Jacobs LD et al. (1996) Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 39:285-294.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Johnston JA, O'Shea JJ (2003) Matching SOCS with function. *Nat Immunol* 4:507-509.
- Jost E, do ON, Dahl E, Maintz CE, Josten P, Habets L, Wilop S, Herman JG, Osieka R, Galm O (2007) Epigenetic alterations complement mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 21:505-510.
- Ju LH, Onogi A, Ueda J, Yamada K, Nakatsu Y, Ohe M, Hata H, Sasaki K, Watanabe T (2005) Polymorphic study of equine antiviral MXA gene. *Biochem Genet* 43:299-305.

- Julius M, Newell K, Maroun C, Haughn L (1991) Functional consequences of CD4-TCR/CD3 interactions. *Semin Immunol* 3:161-166.
- Kallioliadis GD, Ivashkiv LB (2008) IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38. *J Immunol* 180:6325-6333.
- Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T (2004) An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J Immunol* 173:3871-3877.
- Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG, Jr., Conaway RC, Conaway JW (1998) The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 12:3872-3881.
- Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway RC, Conaway JW, Nakayama KI (2004) VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* 18:3055-3065.
- Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ (1996) Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382:174-177.
- Kappes DJ (2007) CD4 and CD8: hogging all the Lck. *Immunity* 27:691-693.
- Karp CL, van Boxel-Dezaire AH, Byrnes AA, Nagelkerken L (2001) Interferon-beta in multiple sclerosis: altering the balance of interleukin-12 and interleukin-10? *Curr Opin Neurol* 14:361-368.
- Katze MG, He Y, Gale M, Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2:675-687.
- Kawamura M, McVicar DW, Johnston JA, Blake TB, Chen YQ, Lal BK, Lloyd AR, Kelvin DJ, Staples JE, Ortaldo JR, et al. (1994) Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6374-6378.
- Khan OA, Xia Q, Bever CT, Jr., Johnson KP, Panitch HS, Dhib-Jalbut SS (1996) Interferon beta-1b serum levels in multiple sclerosis patients following subcutaneous administration. *Neurology* 46:1639-1643.
- Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG, Jr. (1995) Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 269:1444-1446.
- King MC, Raposo G, Lemmon MA (2004) Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8957-8962.
- Kinjyo I, Inoue H, Hamano S, Fukuyama S, Yoshimura T, Koga K, Takaki H, Himeno K, Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A (2006) Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med* 203:1021-1031.
- Kitamura Y, Shimohama S, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Taniguchi T (1997) Alteration of transcription factors NF-kappaB and STAT1 in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 237:17-20.
- Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, Pratt KL, Bezrodnik L, Jasper H, Tepper A, Heinrich JJ, Rosenfeld RG (2003) Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med* 349:1139-1147.
- Kondo T, Takata H, Matsuki F, Takiguchi M (2009) Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol* 182:1794-1798.

- Konig R, Zhou W (2004) Signal transduction in T helper cells: CD4 coreceptors exert complex regulatory effects on T cell activation and function. *Curr Issues Mol Biol* 6:1-15.
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4:69-77.
- Kovanen PE, Leonard WJ (2004) Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev* 202:67-83.
- Krakauer M, Sorensen P, Khademi M, Olsson T, Sellebjerg F (2008) Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon-beta treatment increases IL-10 mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression. *Mult Scler* 14:622-630.
- Krebs DL, Hilton DJ (2000) SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113 (Pt 16):2813-2819.
- Krensky AM, Sanchez-Madrid F, Robbins E, Nagy JA, Springer TA, Burakoff SJ (1983) The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J Immunol* 131:611-616.
- Kroetz MB (2005) SUMO: a ubiquitin-like protein modifier. *Yale J Biol Med* 78:197-201.
- Lang R, Pauleau AL, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ (2003) SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol* 4:546-550.
- Larousserie F, Pflanz S, Coulomb-L'Hermine A, Brousse N, Kastelein R, Devergne O (2004) Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. *J Pathol* 202:164-171.
- Larsen L, Ropke C (2002) Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 110:833-844.
- Le Deist F, de Saint Basile G, Rieux-Laucat F, Hivroz C, Fischer A (2007) [Expression anomalies of the CD3-TCR complex expression and immunodeficiencies]. *Med Sci (Paris)* 23:161-166.
- Leahy DJ (1995) A structural view of CD4 and CD8. *FASEB J* 9:17-25.
- Leo O, Foo M, Henkart PA, Perez P, Shinohara N, Segal DM, Bluestone JA (1987) Role of accessory molecules in signal transduction of cytolytic T lymphocyte by anti-T cell receptor and anti-Ly-6.2C monoclonal antibodies. *J Immunol* 139:3556-3563.
- Leonard WJ (2001) Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* 1:200-208.
- Leonard WJ, O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16:293-322.
- Leroith D, Nissley P (2005) Knock your SOCS off! *J Clin Invest* 115:233-236.
- Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662.
- Li DK, Paty DW (1999) Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon-beta1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. Prevention of Relapses and Disability by Interferon-beta1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 46:197-206.
- Li H, Ahonen TJ, Alanen K, Xie J, LeBaron MJ, Pretlow TG, Ealley EL, Zhang Y, Nurmi M, Singh B, Martikainen PM, Nevalainen MT (2004) Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer Res* 64:4774-4782.

- Li X, Leung S, Burns C, Stark GR (1998) Cooperative binding of Stat1-2 heterodimers and ISGF3 to tandem DNA elements. *Biochimie* 80:703-710.
- Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR, Strom TB (2001) IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 7:114-118.
- Li Y, Chu N, Rostami A, Zhang GX (2006) Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J Immunol* 177:1679-1688.
- Lin J, Weiss A (2001) T cell receptor signalling. *J Cell Sci* 114:243-244.
- Lin W, Harding HP, Ron D, Popko B (2005) Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *J Cell Biol* 169:603-612.
- Lin W, Kemper A, Dupree JL, Harding HP, Ron D, Popko B (2006) Interferon-gamma inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress. *Brain* 129:1306-1318.
- Liu J, Guan X, Ma X (2007) Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. *J Exp Med* 204:141-152.
- Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 11:179-186.
- Liu YC, Penninger J, Karin M (2005) Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 5:941-952.
- Lu L, Cantor H (2008) Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 5:401-406.
- Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ (2003) IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15047-15052.
- Mahrour N, Redwine WB, Florens L, Swanson SK, Martin-Brown S, Bradford WD, Staehling-Hampton K, Washburn MP, Conaway RC, Conaway JW (2008) Characterization of Cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to Elongin BC-based ubiquitin ligases. *J Biol Chem* 283:8005-8013.
- Maier J, Kincaid C, Pagenstecher A, Campbell IL (2002) Regulation of signal transducer and activator of transcription and suppressor of cytokine-signaling gene expression in the brain of mice with astrocyte-targeted production of interleukin-12 or experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 160:271-288.
- Malissen B (2003) An evolutionary and structural perspective on T cell antigen receptor function. *Immunol Rev* 191:7-27.
- Malmgaard L (2004) Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 24:439-454.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
- Marine JC, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, Yoshimura A, Ihle JN (1999) SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 98:609-616.
- Markowitz CE (2007) Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology* 68:S8-11.

- Martinez-Aviles L, Besses C, Alvarez-Larran A, Cervantes F, Hernandez-Boluda JC, Bellosillo B (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 92:1717-1718.
- Mathian A, Koutouzov S (2008) [Interferon-alpha: a key cytokine in systemic lupus erythematosus pathogenesis]. *Rev Med Interne* 29:696-700.
- Matsui M, Kishida T, Nakano H, Yoshimoto K, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Yoshimoto T, Hisa Y, Mazda O (2009) Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res* 69:2523-2530.
- Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A (1997) CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89:3148-3154.
- Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, Ohtsuka S, Suzuki A, Hayashi I, Tsuji K, Nakahata T, Okabe M, Yamada S, Yoshimura A (1999) Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 19:6396-6407.
- Mazza C, Malissen B (2007) What guides MHC-restricted TCR recognition? *Semin Immunol* 19:225-235.
- Mazzarella G, MacDonald TT, Salvati VM, Mulligan P, Pasquale L, Stefanile R, Lionetti P, Auricchio S, Pallone F, Troncone R, Monteleone G (2003) Constitutive activation of the signal transducer and activator of transcription pathway in celiac disease lesions. *Am J Pathol* 162:1845-1855.
- McBride KM, McDonald C, Reich NC (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J* 19:6196-6206.
- McDonald C, Reich NC (1999) Cooperation of the transcriptional coactivators CBP and p300 with Stat6. *J Interferon Cytokine Res* 19:711-722.
- McGeachy MJ, Cua DJ (2008) Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28:445-453.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM (2005) Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175:3025-3032.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84:431-442.
- Metcalf D, Mifsud S, Di Rago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS (2002) Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:943-948.
- Metcalf D, Greenhalgh CJ, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS (2000) Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* 405:1069-1073.
- Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG (1990) Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62:379-390.
- Minegishi Y, Karasuyama H (2007) Hyperimmunoglobulin E syndrome and tyrosine kinase 2 deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7:506-509.

- Miyazaki Y, Inoue H, Matsumura M, Matsumoto K, Nakano T, Tsuda M, Hamano S, Yoshimura A, Yoshida H (2005) Exacerbation of experimental allergic asthma by augmented Th2 responses in WSX-1-deficient mice. *J Immunol* 175:2401-2407.
- Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uze G (1999) The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* 19:1069-1098.
- Montag DT, Lotze MT (2006) Successful simultaneous measurement of cell membrane and cytokine induced phosphorylation pathways [CIPP] in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 313:48-60.
- Morishima N, Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Mizuguchi J, Yoshimoto T (2005) Augmentation of effector CD8+ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J Immunol* 175:1686-1693.
- Mosmann TR, Li L, Sad S (1997) Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* 9:87-92.
- Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR, David M (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell* 104:731-741.
- Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J, Neurath MF (2005) Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 100:64-72.
- Mullan PB, Hosey AM, Buckley NE, Quinn JE, Kennedy RD, Johnston PG, Harkin DP (2005) The 2,5 oligoadenylate synthetase/RNaseL pathway is a novel effector of BRCA1- and interferon-gamma-mediated apoptosis. *Oncogene* 24:5492-5501.
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918-1921.
- Mullings RE, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL, Bucchieri F, Djukanovic R, Howarth PH, Harper S, Holgate ST, Davies DE (2001) Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 108:832-838.
- Murray PJ (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178:2623-2629.
- Musso A, Dentelli P, Carlino A, Chiusa L, Repici A, Sturm A, Fiocchi C, Rizzetto M, Pegoraro L, Sategna-Guidetti C, Brizzi MF (2005) Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 11:91-98.
- Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, Salmeen A, Barford D, Tonks NK (2001) TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 276:47771-47774.
- Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387:924-929.
- Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kawazoe Y, Kohzaki H, Morita Y, Nakagawa R, Narazaki M, Adachi K, Yoshimoto T, Nakanishi K, Kishimoto T (2001) SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo. *Immunity* 14:535-545.
- Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T, Yoshizaki K, Naka T, Kishimoto T (1998) Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are

- required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13130-13134.
- Neel BG, Gu H, Pao L (2003) The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 28:284-293.
- Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K (1998) Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93:397-409.
- Nevalainen MT, Xie J, Torhorst J, Bubendorf L, Haas P, Kononen J, Sauter G, Rui H (2004) Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis. *J Clin Oncol* 22:2053-2060.
- Ng DC, Court NW, dos Remedios CG, Bogoyevitch MA (2003) Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 57:333-346.
- Nicholson SE, Metcalf D, Sprigg NS, Columbus R, Walker F, Silva A, Cary D, Willson TA, Zhang JG, Hilton DJ, Alexander WS, Nicola NA (2005) Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-5 is a potential negative regulator of epidermal growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2328-2333.
- Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (2000) Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6493-6498.
- Noppert SJ, Fitzgerald KA, Hertzog PJ (2007) The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol* 85:446-457.
- Noronha A, Toscas A, Jensen MA (1993) Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 46:145-153.
- Notarangelo LD, Giliani S, Mella P, Schumacher RF, Mazza C, Savoldi G, Rodriguez-Perez C, Badolato R, Mazzolari E, Porta F, Candotti F, Ugazio AG (2000) Combined immunodeficiencies due to defects in signal transduction: defects of the gamma-c-JAK3 signaling pathway as a model. *Immunobiology* 202:106-119.
- Novick D, Cohen B, Rubinstein M (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77:391-400.
- Nussenblatt RB (2002) Bench to bedside: new approaches to the immunotherapy of uveitic disease. *Int Rev Immunol* 21:273-289.
- O'Shea JJ, Notarangelo LD, Johnston JA, Candotti F (1997) Advances in the understanding of cytokine signal transduction: the role of Jaks and STATs in immunoregulation and the pathogenesis of immunodeficiency. *J Clin Immunol* 17:431-447.
- O'Shea JJ, Pesu M, Borie DC, Changelian PS (2004) A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. *Nat Rev Drug Discov* 3:555-564.
- O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC (2007) Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 44:2497-2506.
- Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, Takaki H, Sanada T, Minoda Y, Koga K, Takaesu G, Maehara Y, Iida M, Yoshimura A (2006) Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 131:179-193.
- Oltz EM (2001) Regulation of antigen receptor gene assembly in lymphocytes. *Immunol Res* 23:121-133.

- Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT, Ramberg J, Lipsky PE (1991) Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 147:2913-2921.
- Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T (2006a) IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol* 177:7579-7587.
- Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Takeda K, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T (2006b) IL-27 suppresses CD28-mediated [correction of medicated] IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 176:2773-2780.
- Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Hata K, Fukai F, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T (2005) A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol* 175:2191-2200.
- Palvimo JJ (2007) PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 35:1405-1408.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93:385-395.
- Park C, Lecomte MJ, Schindler C (1999) Murine Stat2 is uncharacteristically divergent. *Nucleic Acids Res* 27:4191-4199.
- Park C, Li S, Cha E, Schindler C (2000) Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13:795-804.
- Paty DW, Li DK (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43:662-667.
- Paty DW, Li DK (2001) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology* 57:S10-15.
- Paunovic V, Carroll HP, Vandebroek K, Gadina M (2008) Signalling, inflammation and arthritis: crossed signals: the role of interleukin (IL)-12, -17, -23 and -27 in autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)* 47:771-776.
- Pavlovic J, Haller O, Staeheli P (1992) Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol* 66:2564-2569.
- Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA (2000) Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101:259-270.
- Pellegrini S, Schindler C (1993) Early events in signalling by interferons. *Trends Biochem Sci* 18:338-342.
- Peltekian C, Gordien E, Garreau F, Meas-Yedid V, Soussan P, Williams V, Chaix ML, Olivo-Marin JC, Brechet C, Kremersdorf D (2005) Human MxA protein participates to the interferon-related inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice. *J Hepatol* 43:965-972.
- Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos AJ (2001) CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2:389-396.
- Pesu M, Candotti F, Husa M, Hofmann SR, Notarangelo LD, O'Shea JJ (2005) Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. *Immunol Rev* 203:127-142.

- Pfeffer LM, Basu L, Pfeffer SR, Yang CH, Murti A, Russell-Harde D, Croze E (1997) The short form of the interferon alpha/beta receptor chain 2 acts as a dominant negative for type I interferon action. *J Biol Chem* 272:11002-11005.
- Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA (2004) WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172:2225-2231.
- Pflanz S et al. (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16:779-790.
- Piessevaux J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J (2008) The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:371-381.
- Piessevaux J, Lavens D, Montoye T, Wauman J, Catteeuw D, Vandekerckhove J, Belsham D, Peelman F, Tavernier J (2006) Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *J Biol Chem* 281:32953-32966.
- Pilling D, Akbar AN, Girdlestone J, Orteu CH, Borthwick NJ, Amft N, Scheel-Toellner D, Buckley CD, Salmon M (1999) Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis. *Eur J Immunol* 29:1041-1050.
- Platanias LC (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5:375-386.
- Pogue SL, Preston BT, Stalder J, Bebbington CR, Cardarelli PM (2004) The receptor for type I IFNs is highly expressed on peripheral blood B cells and monocytes and mediates a distinct profile of differentiation and activation of these cells. *J Interferon Cytokine Res* 24:131-139.
- Pokrovskaja K, Panaretakis T, Grander D (2005) Alternative signaling pathways regulating type I interferon-induced apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 25:799-810.
- Qin H, Wilson CA, Lee SJ, Benveniste EN (2006) IFN-beta-induced SOCS-1 negatively regulates CD40 gene expression in macrophages and microglia. *FASEB J* 20:985-987.
- Qin H, Niyongere SA, Lee SJ, Baker BJ, Benveniste EN (2008) Expression and functional significance of SOCS-1 and SOCS-3 in astrocytes. *J Immunol* 181:3167-3176.
- Qin H, Reynolds LS, Cong Y, Elson OC, Benveniste E (2009) Involvement of SOCS proteins in the inhibitory effect of IL-27 on Th17 development. Abstract- *Journal of Immunology*.
- Qing Y, Costa-Pereira AP, Watling D, Stark GR (2005) Role of tyrosine 441 of interferon-gamma receptor subunit 1 in SOCS-1-mediated attenuation of STAT1 activation. *J Biol Chem* 280:1849-1853.
- Ragimbeau J, Dondi E, Alcover A, Eid P, Uze G, Pellegrini S (2003) The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *EMBO J* 22:537-547.
- Ram PA, Waxman DJ (1999) SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 274:35553-35561.
- Reich NC, Liu L (2006) Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6:602-612.
- Remoli ME, Gafa V, Giacomini E, Severa M, Lande R, Coccia EM (2007) IFN-beta modulates the response to TLR stimulation in human DC: involvement of IFN regulatory factor-1 (IRF-1) in IL-27 gene expression. *Eur J Immunol* 37:3499-3508.
- Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS (2001) Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9324-9329.
- Rosas LE, Satoskar AA, Roth KM, Keiser TL, Barbi J, Hunter C, de Sauvage FJ, Satoskar AR (2006) Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice

- display enhanced resistance to leishmania donovani infection but develop severe liver immunopathology. *Am J Pathol* 168:158-169.
- Ross JA, Nagy ZS, Cheng H, Stepkowski SM, Kirken RA (2007) Regulation of T cell homeostasis by JAKs and STATs. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 55:231-245.
- Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24:419-466.
- Russell-Harde D, Wagner TC, Perez HD, Croze E (1999) Formation of a uniquely stable type I interferon receptor complex by interferon beta is dependent upon particular interactions between interferon beta and its receptor and independent of tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 255:539-544.
- Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, Riedy MC, Roberts JL, Aman MJ, Migone TS, Noguchi M, Markert ML, Buckley RH, O'Shea JJ, Leonard WJ (1995) Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 270:797-800.
- Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S, Lu KP (2003) Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 12:1413-1426.
- Sadler AJ, Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8:559-568.
- Sallusto F, Lanzavecchia A (2009) Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 39:2076-2082.
- Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, Caserta S, Zamoyska R (2009) T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* 228:9-22.
- Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14:778-809, table of contents.
- Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A (2000) CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 275:29338-29347.
- Sasaki A, Inagaki-Ohara K, Yoshida T, Yamanaka A, Sasaki M, Yasukawa H, Koromilas AE, Yoshimura A (2003) The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J Biol Chem* 278:2432-2436.
- Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston JA, Yoshimura A (1999) Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4:339-351.
- Sastre-Garriga J, Comabella M, Brieva L, Rovira A, Tintore M, Montalban X (2004) Decreased MMP-9 production in primary progressive multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 10:376-380.
- Satterthwaite G, Francis SE, Suvarna K, Blakemore S, Ward C, Wallace D, Braddock M, Crossman D (2005) Differential gene expression in coronary arteries from patients presenting with ischemic heart disease: further evidence for the inflammatory basis of atherosclerosis. *Am Heart J* 150:488-499.
- Scheinman EJ, Avni O (2009) Transcriptional regulation of GATA3 in T helper cells by the integrated activities of transcription factors downstream of the interleukin-4 receptor and T cell receptor. *J Biol Chem* 284:3037-3048.
- Schindler C (1999) Cytokines and JAK-STAT signaling. *Exp Cell Res* 253:7-14.

- Schindler CW (2002) Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 109:1133-1137.
- Schleicher U, Mattner J, Blos M, Schindler H, Rollinghoff M, Karaghiosoff M, Muller M, Werner-Felmayer G, Bogdan C (2004) Control of *Leishmania major* in the absence of Tyk2 kinase. *Eur J Immunol* 34:519-529.
- Schmidt D, Muller S (2003) PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci* 60:2561-2574.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 356:459-468.
- Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston JA, Yoshimura A, Kubo M (2003) SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat Med* 9:1047-1054.
- Shankaranarayanan P, Chaitidis P, Kuhn H, Nigam S (2001) Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 276:42753-42760.
- Sharrocks AD (2006) PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev* 20:754-758.
- Shaw MH, Freeman GJ, Scott MF, Fox BA, Bzik DJ, Belkaid Y, Yap GS (2006) Tyk2 negatively regulates adaptive Th1 immunity by mediating IL-10 signaling and promoting IFN-gamma-dependent IL-10 reactivation. *J Immunol* 176:7263-7271.
- Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN (1996) Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380:630-633.
- Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, Yamashita M, Numata A, Takase K, Kobayashi S, Shibata S, Asano Y, Gondo H, Sekiguchi K, Nakayama K, Nakayama T, Okamura T, Okamura S, Niho Y (2000) Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* 13:561-571.
- Shinohara ML, Kim JH, Garcia VA, Cantor H (2008) Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity* 29:68-78.
- Shuai K (2006) Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res* 16:196-202.
- Shuai K, Liu B (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3:900-911.
- Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE (1993) Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 366:580-583.
- Simoncic PD, Lee-Loy A, Barber DL, Tremblay ML, McGlade CJ (2002) The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 12:446-453.
- Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U, Mak TW (2002) Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 99:618-626.

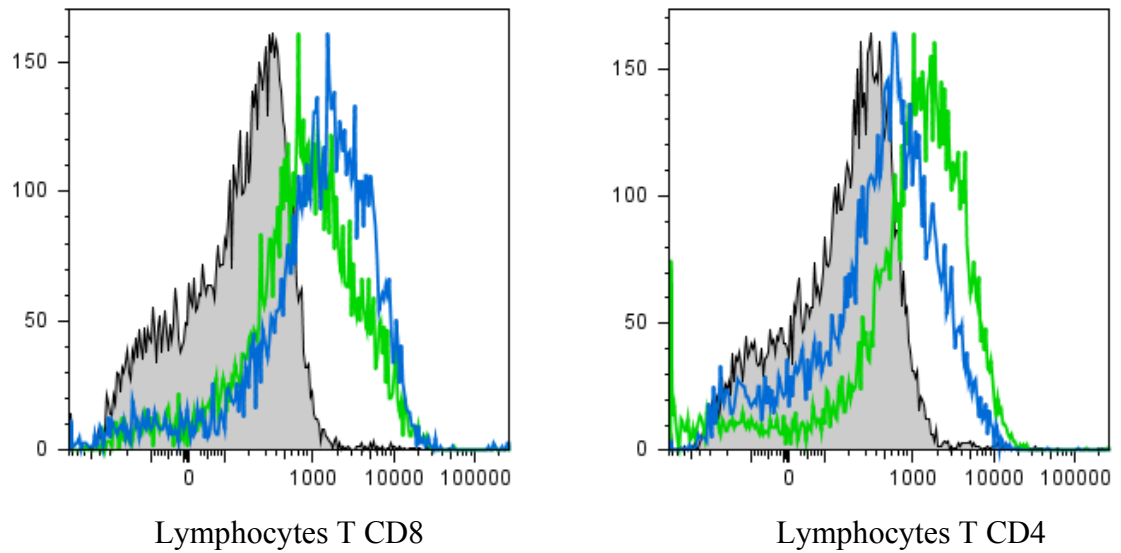
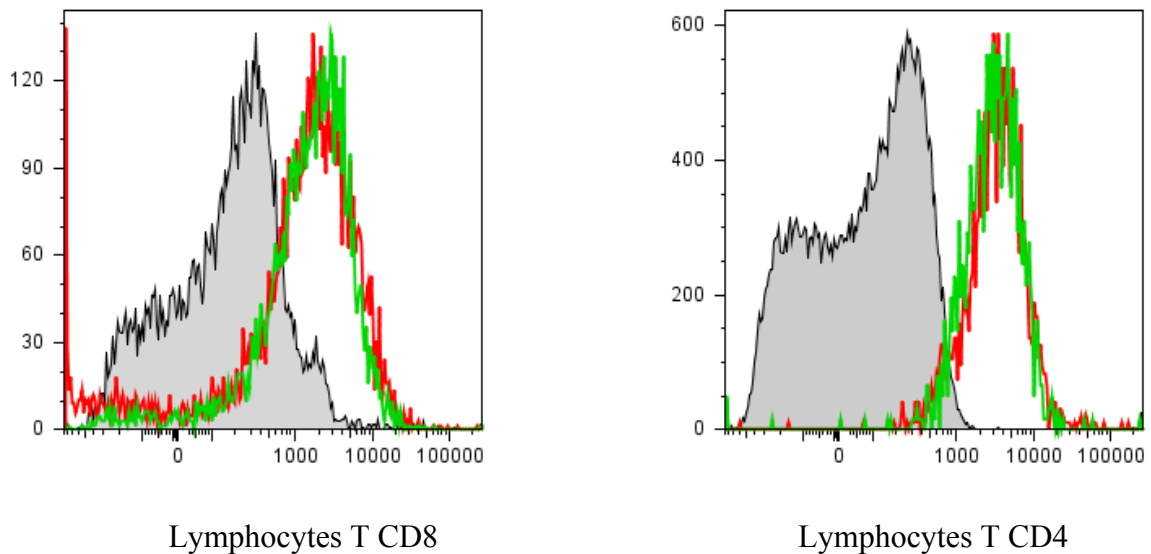
- Song XT, Evel-Kabler K, Rollins L, Aldrich M, Gao F, Huang XF, Chen SY (2006) An alternative and effective HIV vaccination approach based on inhibition of antigen presentation attenuators in dendritic cells. *PLoS Med* 3:e11.
- Spolski R, Leonard WJ (2009) Cytokine mediators of Th17 function. *Eur J Immunol* 39:658-661.
- Sprecher CA, Grant FJ, Baumgartner JW, Presnell SR, Schrader SK, Yamagiwa T, Whitmore TE, O'Hara PJ, Foster DF (1998) Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 246:82-90.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264.
- Stark JL, Cross AH (2006) Differential expression of suppressors of cytokine signaling-1 and -3 and related cytokines in central nervous system during remitting versus non-remitting forms of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol* 18:347-353.
- Starr R, Hilton DJ (1998) SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1081-1085.
- Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS (1998) Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14395-14399.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-921.
- Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O'Shea JJ, Hunter CA (2007) Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8:1363-1371.
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA (2006) Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7:937-945.
- Subramanya S, Armant M, Salkowitz-Bokal J, Nyakeriga A, Kan-Mitchell J, Shankar P (2009) OR.51. Dendritic Cell-specific Delivery of siRNA Targeting SOCS1 Enhances HIV Gag-specific CD8 T Cell Response Abstract-FOCIS 2009 Abstract Supplement - 9th Annual Meeting, Federation of Clinical Immunology Societies
- Sun J, Leahy DJ, Kavathas PB (1995) Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domains of MHC class I. *J Exp Med* 182:1275-1280.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH (2002) Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295:338-342.
- Taga K, Tosato G (1992) IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148:1143-1148.
- Takase H, Yu CR, Liu X, Fujimoto C, Gery I, Egwuagu CE (2005) Induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the retina during experimental autoimmune uveitis (EAU): potential neuroprotective role of SOCS proteins. *J Neuroimmunol* 168:118-127.

- Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H (2003) Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 170:4886-4890.
- Takeda K, Akira S (2000) STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:199-207.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3801-3804.
- Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1996) Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380:627-630.
- Tang J, Zhou R, Luger D, Zhu W, Silver PB, Grajewski RS, Su SB, Chan CC, Adorini L, Caspi RR (2009) Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol* 182:4624-4632.
- Taniguchi H, Iwasaki Y, Takahashi A, Shimomura H, Moriya A, Yu PC, Umeoka F, Fujioka S, Koide N, Shiratori Y (2007) Intrahepatic mRNA levels of type I interferon receptor and interferon-stimulated genes in genotype 1b chronic hepatitis C. Association between IFNAR1 mRNA level and sustained response to interferon therapy. *Intervirology* 50:32-39.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19:623-655.
- ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K (2002) Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22:5662-5668.
- Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382:171-174.
- Thomas HC, Torok ME, Forton DM, Taylor-Robinson SD (1999) Possible mechanisms of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 31 Suppl 1:152-159.
- Thomas ML (1989) The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 7:339-369.
- Valentino L, Pierre J (2006) JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 71:713-721.
- Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB (1988) The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55:301-308.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
- Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein RA, Saris C, Hunter CA (2003) The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19:645-655.
- Villarino AV, Stumhofer JS, Saris CJ, Kastelein RA, de Sauvage FJ, Hunter CA (2006) IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol* 176:237-247.
- Vincenti F (2008) Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 121:299-306; quiz 307-298.

- Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Jr., Kuriyan J (1998) Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279:1048-1052.
- Vivier E, Malissen B (2005) Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol* 6:17-21.
- Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA (2006) Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 6:940-952.
- Vosslamber S, van Baarsen LG, Verweij CL (2009) Pharmacogenomics of IFN-beta in multiple sclerosis: towards a personalized medicine approach. *Pharmacogenomics* 10:97-108.
- Waeckerle-Men Y, Starke A, Wahl PR, Wuthrich RP (2007) Limited costimulatory molecule expression on renal tubular epithelial cells impairs T cell activation. *Kidney Blood Press Res* 30:421-429.
- Waiboci LW, Ahmed CM, Mujtaba MG, Flowers LO, Martin JP, Haider MI, Johnson HM (2007) Both the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) kinase inhibitory region and SOCS-1 mimetic bind to JAK2 autophosphorylation site: implications for the development of a SOCS-1 antagonist. *J Immunol* 178:5058-5068.
- Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, Weedon H, Papangelis V, Beroukas D, Roberts-Thomson PJ, Smith MD (2006) Expression of Jak3, STAT1, STAT4, and STAT6 in inflammatory arthritis: unique Jak3 and STAT4 expression in dendritic cells in seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65:149-156.
- Wang J, Wang G, Sun B, Li H, Mu L, Wang Q, Li G, Shi L, Jin L, Kostulas N (2008) Interleukin-27 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis during bone marrow stromal cell treatment. *J Autoimmun* 30:222-229.
- Wang JH, Reinherz EL (2002) Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol* 38:1039-1049.
- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME (2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950-957.
- Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, Schild HJ, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF (2005) EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol* 174:2814-2824.
- Woodland DL, Dutton RW (2003) Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 15:336-342.
- Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA (2009) The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 66:2603-2622.
- Wormald S, Hilton DJ (2004) Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279:821-824.
- Xia CQ, Kao KJ (2003) Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Scand J Immunol* 58:23-32.

- Yamamoto K, Yamaguchi M, Miyasaka N, Miura O (2003) SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 310:1188-1193.
- Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ (2004) The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 5:253.
- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA (2008) IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454:350-352.
- Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A (1999) The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 18:1309-1320.
- Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A (2003) IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 4:551-556.
- Yeh TC, Pellegrini S (1999) The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell Mol Life Sci* 55:1523-1534.
- Yoshida H, Miyazaki Y (2008) Interleukin 27 signaling pathways in regulation of immune and autoimmune responses. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2379-2383.
- Yoshida H, Yoshiyuki M (2008) Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunol Rev* 226:234-247.
- Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG (2001) SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28:29-35.
- Yoshimura A, Naka T, Kubo M (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7:454-465.
- Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A (1995) A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* 14:2816-2826.
- Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H (2006) Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol* 177:5377-5385.
- Young JW, Koulova L, Soergel SA, Clark EA, Steinman RM, Dupont B (1992) The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 90:229-237.
- Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, Vistica BP, Gery I, Egwuagu CE (2003) Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells. *J Biol Chem* 278:29752-29759.
- Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, Vistica BP, Chen J, Guo Y, Gery I, Egwuagu CE (2004) Cell proliferation and STAT6 pathways are negatively regulated in T cells by STAT1 and suppressors of cytokine signaling. *J Immunol* 173:737-746.
- Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SB, Alexander WS, Metcalf D,

- Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2071-2076.
- Zhou Y, Wang S, Gobl A, Oberg K (2001) Interferon alpha induction of Stat1 and Stat2 and their prognostic significance in carcinoid tumors. *Oncology* 60:330-338.
- Zimmerer JM, Lesinski GB, Kondadasula SV, Karpa VI, Lehman A, Raychaudhury A, Becknell B, Carson WE, 3rd (2007) IFN-alpha-induced signal transduction, gene expression, and antitumor activity of immune effector cells are negatively regulated by suppressor of cytokine signaling proteins. *J Immunol* 178:4832-4845.
- Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, Dalpke AH (2006) Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J Immunol* 176:1840-1847.

ANNEXE**Figure 21** : Détection de SOCS-1 par cytométrie de flux**Figure 22** : Détection de SOCS-3 par cytométrie de flux

N.B. L'isotype est marqué en gris, la superposition des couleurs (vert et bleu, vert et rouge) indique deux donneurs distincts testés au même moment. Les anticorps sont les même que ceux qui ont été utilisés pour nos expériences d'immunocytologie. Expériences effectuées par Raphaël Schneider.

Lama El-Khoury - Curriculum Vitae

Hôpital Notre-Dame
1560 Sherbrooke Est, local Y-3609
Montréal, Québec, Canada
H2L 4M1

1. Liste des Diplômes obtenus ou en cours

- **Microprogramme en Enseignement Supérieur**

Université de Montréal – Faculté des Sciences de l'Éducation
Département de Psychopédagogie et Andragogie
Date de fin prévue – Juin 2010

- **Maîtrise en Microbiologie et Immunologie (M.Sc)**

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Université de Montréal – Faculté de Médecine
Département de Microbiologie et Immunologie
Directrice de recherche – Dr. Nathalie Arbour
Date de début – Septembre 2007
Date de fin – Août 2009

Projet – “Expression des SOCS-1 et SOCS-3 par les lymphocytes T humains en réponse à des cytokines immunomodulatrices.”

Financement – Bourse du Programme de Formation en Neuroinflammation
-(Instituts de Recherche en Santé du Canada)

- **Baccalauréat en Microbiologie et Immunologie (B.Sc)**

Université de Montréal – Facultés de Médecine/Arts et Sciences
Département de Microbiologie et Immunologie
Diplôme obtenu – Juin 2007

Stage de session :
Directrice de recherche- Dr. Françoise Le Deist

Projet- "Effet de la durée de l'entreposage des culots globulaires sur l'activation leucocytaire."

2. Liste des Présentations

Présentations orales

- **El-Khoury, L.**, Beauseigle, D and Arbour, N. Expression de SOCS-1 et SOCS-3 dans le contexte de la Sclérose en Plaques. Séminaire des étudiants gradués, Université de Montréal, Québec. 27 janvier 2008.
- **El-Khoury, L.**, Beauseigle, D and Arbour, N. Expression of SOCS-1 and SOCS-3 in in T lymphocytes in response to cytokines. Training Grant Seminar. Université McGill, Montréal, Québec. 26 mars 2009.

Présentations par affiche

- **El-Khoury, L.**, Beauseigle, D and Arbour, N. Expression of SOCS-1 and SOCS-3 in the context of Multiple Sclerosis. 3rd Symposium of Neuroinflammation. Hôpital Douglas, Université McGill, Montréal, Québec. 30 mai 2008
- **El-Khoury, L.**, Beauseigle, D and Arbour, N. Expression of SOCS-1 and SOCS-3 in the context of Multiple Sclerosis. 4^{ième} Retraite Annuelle du Centre d'Excellence en Neuromique. Montebello, Québec. 16–17 Janvier 2009
- **El-Khoury, L.**, Beauseigle, D and Arbour, N. Expression of SOCS-1 and SOCS-3 in human T lymphocytes in response to cytokines. 11^{ième} Congrès Annuel du Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec. 19 mars 2009.
- **El-Khoury, L.**, Beauseigle, D and Arbour, N. Expression of SOCS-1 and SOCS-3 in human T lymphocytes in response to cytokines. Immunologie Montréal. Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, 29 avril 2009.
- **El-Khoury, L.**, Beauseigle, D and Arbour, N. Expression of SOCS-1 and SOCS-3 in human T lymphocytes in response to cytokines. 4th Symposium of Neuroinflammation. New Residence Hall, Université McGill, Montréal, Québec. 22 mai 2009.

3. Liste des Participations aux Congrès (sans présentations)

- 3^{ième} Retraite Annuelle du Centre d'Excellence en Neuromique, Sainte Adèle, Québec, 25-26 janvier 2008.
- World Congress on Treatment and Research in Multiple Sclerosis. Palais des Congrès, Montréal, Québec. 17-20 septembre 2008.
- Suivi du cours -Overview of MS for the non-clinician. World Congress on Treatment and Research in Multiple Sclerosis. Palais des Congrès, Montréal, Québec. 17-20 septembre 2008.

4. Distinctions

- Bourse *End-MS* pour participer au congrès du World Congress on Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Palais des Congrès, Montréal, Québec. 17-20 septembre 2008.

