



HAL
open science

Caractérisation des TCR et de la cible antigénique de lymphocytes T CD8+ impliqués dans la sclérose en plaques

Garcia Alexandra

► **To cite this version:**

Garcia Alexandra. Caractérisation des TCR et de la cible antigénique de lymphocytes T CD8+ impliqués dans la sclérose en plaques . Immunologie. 2017. hal-01623116

HAL Id: hal-01623116

<https://ephe.hal.science/hal-01623116>

Submitted on 25 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté
par

Garcia Alexandra

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Caractérisation des TCR et de la cible antigénique de lymphocytes T CD8+
impliqués dans la sclérose en plaques**

soutenu le 11 octobre 2017, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris

devant le jury suivant :

Pr Bruno Canque – Président
Pr David Laplaud – Tuteur scientifique
Pr Giovanni Stevanin – Tuteur pédagogique
Dr Sylvaine You – Rapporteur
Dr Mohamed El Behi – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr David Laplaud

Intitulé de la structure d'accueil : Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI) UMR 1064, INSERM, Université de Nantes Institut de Transplantation Urologie Néphrologie, CHU Nantes

Directeur : *Pr Régis Josien*

et de

Pr Giovanni Stevanin

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, CHU Pitié-Salpêtrière, 75013, Paris

Directeur : *Pr Alexis Brice*

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : *Approche Translationnelle des Maladies Neurodégénératives*



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté
par

Garcia Alexandra

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Caractérisation des TCR et de la cible antigénique de lymphocytes T CD8+
impliqués dans la sclérose en plaques**

soutenu le 11 octobre 2017, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris

devant le jury suivant :

Pr Bruno Canque – Président
Pr David Laplaud – Tuteur scientifique
Pr Giovanni Stevanin – Tuteur pédagogique
Dr Sylvaine You – Rapporteur
Dr Mohamed El Behi – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr David Laplaud

Intitulé de la structure d'accueil : Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI) UMR 1064, INSERM, Université de Nantes Institut de Transplantation Urologie Néphrologie, CHU Nantes

Directeur : *Pr Régis Josien*

et de

Pr Giovanni Stevanin

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, CHU Pitié-Salpêtrière, 75013, Paris

Directeur : *Pr Alexis Brice*

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : *Approche Translationnelle des Maladies Neurodégénératives*

REMERCIEMENTS

Je commencerai en remerciant l'ensemble des membres de mon jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail. Merci au Dr Sylvaine You d'avoir accepté d'être rapporteur ainsi qu'aux Pr Bruno Canque et Dr Mohamed El Behi d'être respectivement président du jury et examinateur de ce travail. Je remercie particulièrement le Pr Giovanni Stevanin d'avoir accepté d'être mon tuteur pédagogique et de m'avoir si bien conseillé tout au long de ces années.

Je tiens à remercier le Dr Ignacio Anegon et le Pr Régis Josien, directeurs successifs du laboratoire CRTI/INSERM U1064, pour leur accueil au sein de l'unité.

David je tiens à te remercier pour me soutenir et me supporter depuis maintenant 8 ans. Si je devais retenir une seule chose de ces années passées à travailler avec toi, c'est qu'en science rien n'est impossible. Tu as toujours un enthousiasme débordant d'imagination, d'idées, de projets plus ou moins réalisables mais c'est ça qui fait la définition d'un Chercheur. Tu m'as permis de voir l'autre côté du miroir qui est la Médecine, un monde à part entière mais sans lequel nous ne pourrions pas autant avancer et je t'en remercie également.

Je voulais également remercier Sophie Brouard co-directrice de notre équipe. Merci pour ton aide et ta disponibilité. Un jour, tu m'as dit que j'étais l'un des piliers de cette équipe et j'espère lui faire honneur aujourd'hui.

Je tenais également à remercier toutes les personnes qui ont participé à la mise en place de ce projet. Le Pr Klaus Dornmair de l'institut de neuroimmunologie clinique de Munich pour les hybridomes et le plasmide ; le Pr Nathalie Labarrière de l'UMR_S 1232 pour l'ADN du clone CD8 MelanA, Béatrice Clémenceau de l'UMR_S 1232 pour la mise en place des lignées BEBV, Karine Bernardeau de l'UMR_S 1232 pour le tétramère MelanA et de le Pr Renaud Du Pasquier du laboratoire de neuro-immunologie de Lausanne pour la suite de notre collaboration sur la mise en place des lignées du système nerveux central.

Déjà 8 ans que je suis dans ce laboratoire. Certaines périodes sont plus au moins flous dans ma tête... sans doute la vieillesse, l'ivresse ou tout simplement impossible à raconter... mais je vais essayer.

Il y a d'abord cette équipe SEP, ces irréductibles gaulois qui résistent encore est toujours à la transplantation. Merci à Arnaud et Laureline pour leurs corrections du mémoire. Bryan et Marion je voudrais vous remercier pour tout le savoir que vous m'avez apporté (c'est quoi ? c'est un cerveau ? c'est un kiwi ?). Vous êtes des bourreaux de travail et je me suis largement inspiré de vous pour ce mémoire. Laure c'est toi qui à débuté tant bien que mal ce projet. Nous avons fait un bon duo ensemble et même si ton cœur a choisit les Lymphocytes B tu as toujours était disponible pour moi durant toutes ces années.

Depuis 8 ans que je suis dans ce laboratoire j'en ai vu passer des gens. Difficile de faire une liste exhaustive mais si je devais en retenir un (et j'en suis sûr que ça va l'énerver) ce serait toi Antoine. « Mon mari » qui s'est enfuit aux Etats-Unis me laissant « désespérément » seule. Je ne vais pas m'étaler sur ce que je pense de toi car je sais que tu n'aimeras pas mais juste une chose : Just Dance me manque !

Laurent T, un remerciement spécial pour toi. Tu es le roi des blagues et de la BM en résumé tu es l'homme parfait ! Merci pour toute l'aide que tu as pu me donner pour ce projet.

Mathieu, le planificateur de l'extrême, 3 ans déjà ! Ca passe vite, qui vais-je bien pouvoir trouver pour te remplacer ? Promis un jour je te regarderais jouer à Furi du début à la fin et peut être même que je laisserais des « bits » qui sait...

Jérémy, le nouveau futur grand médecin qui dominera un jour le monde ! Merci pour ton aide sur ce mémoire et j'espère que tu es accroché pour ces 3 années ...il te faudra encore plus de remontant pour supporter tout ça.

En tant que trésorière du COPCU (Comité d'organisation du Pâtisserie Contest de l'U1064) je me dois de rendre hommage aux membres du bureau Mélanie N, Sarah, Amédée, Vanessa, Antoine, Mathieu (encore lui !) et tous les participants! Cette compétition que le monde entier nous envie ne serait pas si drôle sans vous. Et puis « le gras c'est la vie » !

Merci à Fabie et Nico D pour votre aide scientifique mais aussi la bonne ambiance que vous dégagent tous les deux au quotidien.

Mélanie C, la « directrice » officieuse de la team B cell ! Tu le sais que les T sont les meilleurs, un jour tu finiras par l'avouer !

Justine, parce que tu es revenue et que je suis super contente d'avoir retrouvé ma copine de ciné et qu'on à passé des soirées tellement mémorables....n'est-ce pas avec Gaëlle P ?! Tu vois bien de quoi je parle « mon kiki »!

Et puis tous les autres Flora G, Annie, Gaëlle T, Juliette, Apo, Gwen, Flora, Sév B, Maxim, Jean-Paul, Eros, Gaëlle B, Charlène, Florian, Mathieu (encore et toujours lui !!) et tant d'autres..... Merci pour ses soirées après le boulot à parler de tout et de rien mais beaucoup de la même chose...

Petit remerciement spécial pour l'ancien « Roi » du labo, tu vois je suis tes pas. Et promis un jour je te le payerai ce diner!

Mes cops Delphine, Sterenn et Linda ! Je vous aime mes poulettes !

Cédric tu sais déjà tout, il n'est pas nécessaire que je rajoute quoi que ce soit. Je t'aime.

Je voudrais remercier toute ma famille qui m'a soutenue dans cette aventure. Je sais que vous ne comprenez pas tout le temps ce que je fais mais l'important c'est que vous sachiez que je le fais avec passion.

Merci à tous

« Tout cela n'est rien. Absolument rien ! Il y a peu de temps quelque chose a fait « Boum ».

Voilà, nous sommes sur une toute petite miette expulsée par ce boum, qui dérive et tournicote sur elle-même, en attendant sa fin, proche ! Sur cette miette de tous petits organismes gesticulent ; ça nait, ça vit, ça meurt. Tout cela n'a aucune conséquence. »

Kaamelott, Livre V, Le dernier jour - Alexandre Astier

TABLE DES MATIERES

I. LA SCLEROSE EN PLAQUES	9
1. DEFINITION	9
2. EPIDEMIOLOGIE DE LA SEP	10
3. ETIOLOGIE DE LA SEP	11
3.1 Facteurs génétiques	11
3.2 Facteurs environnementaux	11
4. LA SEP, MALADIE AUTO-IMMUNE	12
II. LES LYMPHOCYTES IMPLIQUES DANS LA SEP	13
1. LES LYMPHOCYTES B	13
2. LES LYMPHOCYTES T CD4 ⁺	14
3. LES LYMPHOCYTES T CD8 ⁺	15
3.1 Les LT CD8 ⁺ dans le SNC	16
3.2 Les LT CD8 ⁺ dans le LCR	16
3.3 La migration des LT CD8 ⁺ dans le SNC	17
3.1 Les sous-populations de LT CD8 ⁺	17
III. LES LYMPHOCYTES T AUTOREACTIFS	19
1. LE TCR	19
2. LES MECANISMES DE TOLERANCE	20
3. L'ACTIVATION DES LT AUTOREACTIFS DANS LA SEP	21
3.1 Le mimétisme moléculaire	23
3.2 Les doubles TCR	23
3.3 Les superantigènes	23
3.4 Glissement d'épitope et activation non spécifique	24
4. L'ETUDE DU REPERTOIRE	24
4.1 Les outils pour l'étude du répertoire	24
4.2 L'étude du répertoire dans la SEP	26
IV. AUTO-ANTIGENES IMPLIQUES DANS LA SEP	27
V. OBJECTIFS	30
VI. MATERIELS ET METHODES	32
1. INCLUSIONS DES PATIENTS	32
2. LE REPERTOIRE : CHOIX DES FAMILLES D'INTERET	33
3. IDENTIFICATION DU TCR	36
4. CREATION DES PLASMIDES	39
5. MISE EN PLACE DE LIGNEES STABLES D'HYBRIDOMES	41
6. VALIDATIONS DES LIGNEES	42
6.1 Sélection et purification des lignées	42
6.2 Vérification de la sécrétion d'IL-2 par ELISA	43
6.3 Vérification du clone 9 Melan-A par utilisation d'un tétramère	43
7. TEST DE RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE	44
7.1 Peptides de la myéline	45
7.2 Peptides dérivés de protéines apoptotiques	46

7.3	Protéines issues de lysats cellulaires du SNC	46
VII.	RESULTATS.....	49
1.	CARACTERISATION DES LT CD8 ⁺ D'INTERET DANS LE LCR DE PATIENTS	49
2.	VALIDATION DES LIGNEES	52
2.1	Expression du TCR à la membrane	52
2.1	Validation de la sécrétion d'IL-2 après activation du TCR	55
3.	RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE	58
3.1	Reconnaissance de peptides de la myéline.....	58
3.2	Reconnaissance de peptides dérivés de protéines apoptotiques	60
3.3	Reconnaissance de protéines issues de lysats cellulaires du SNC.....	61
VIII.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	66
IX.	ANNEXES	72
X.	BIBLIOGRAPHIE.....	90
XI.	RESUME ET MOTS CLES.....	100

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Les différentes formes d'évolution de la SEP.....	10
Figure 2 : Différenciation des LT CD4 ⁺ naifs en LT helper et leur implication dans la SEP	15
Figure 3 : Organisation des loci codant les chaînes du TCR et structure du TCR.	19
Figure 4 : Mécanismes de tolérance centrale et périphérique.	21
Figure 5 : Mécanismes possibles d'activation périphérique de cellules potentiellement autoréactives.	22
Figure 6 : Caractérisation du TCR V β par technique basse résolution et haute résolution.)	25
Figure 7 : Similitude des clones du SNC retrouvés en périphérie, qui, pour les LT CD8 ⁺ en périphérie tendent vers un phénotype mémoires avec des marqueurs de migration et de cytotoxicité.)	27
Figure 8 : Représentation et comparaison des différentes distributions de longueurs de CDR3 dans le LCR et les LT CD8 ⁺	35
Figure 9 : Comparaison du répertoire des cellules T du LCR amplifiées ou non et des LT CD8 ⁺ du sang.	37
Figure 10 : Efficacité de sélection par cytométrie en flux et vérification du clone contrôle sans TCR.	52
Figure 11 : Validation des clones par cytométrie en flux.	53
Figure 12 : PCR pour vérification de l'expression de l'ARNm du TCR dans 2 lignées transfectées.....	55
Figure 13 : Dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA.	56
Figure 14 : Utilisation d'un tétramère HLA2nT-Melan-A-APC.	57
Figure 15 : Sécrétion d'IL-2 en présence de différents peptides dérivés de la myéline.	59
Figure 16 : Sécrétion d'IL-2 en présence de pool de peptides dérivés de protéines associées dans l'apoptose dans un contexte HLA-A2.....	61
Figure 17 : Vérification des marqueurs de cellules dendritiques après différenciation..	62
Figure 18 : Sécrétion d'IL-2 en présence de lysat cellulaire de neurones/astrocytes dérivés d'IPSc autologues..	63
Figure 19 : Aperçu schématique de la stratégie expérimentale (Siewert et al., 2012).	68

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Données cliniques des patients.....	33
Tableau 2 : Séquences des peptides 2A.....	40
Tableau 3 : Typage HLA du CMH-I et du CMH-II des 3 patients.....	45
Tableau 4 : Vérification de la présence des clones dans les LT CD8 ⁺ du sang pour les patients SoMa et KeBe. ..	50
Tableau 5 : Caractérisation des séquençages des chaînes β et α . ..	51
Tableau 6 : Efficacité des plasmides testés en fonction du peptide 2A inséré entre la chaîne α et β	54

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Expanded CD8 T cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis.....	72
Annexe 2 : Illustration du protocole de CDR3 spectratyping et d'amplification par PCR unicellulaire des chaînes β et α . A.....	86
Annexe 3 : Liste des amorces.....	87
Annexe 4 : Séquence signal.....	88

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

ACTB : Actine cytoplasmique beta 1

Ag : Antigène

ARN : Acide ribonucléique

ADN : Acide désoxyribonucléique

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

CCR : Récepteur aux chimiokines (Chemokine Receptor)

CDR3 : Région 3 déterminant la complémentarité (Complementary Determining Region 3)

CMH-I/II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I/II

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

cTEC : Cellules Epithéliales Thymiques Corticales

CTLA-4 : Protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4)

DC : Cellules dendritiques (Dendritic cell)

DN : Double négative

DP : Double Positive

EAE : Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale

EBV : Virus de l'Epstein Barr

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FoxP3 : Forkhead box P3

GDIS : Inhibiteur de dissociation rho GDP 2

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GZM : Granzyme

HIV : Virus de l'Immunodéficience Humaine

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IRES : Internal ribosome entry site

LAM1 : Lamelle B1

LB : Lymphocyte B

LBregs : LB régulateurs

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

LT : Lymphocyte T

LTh/c : LT auxiliaire (helper)/cytotoxiques

LTregs : LT régulateurs

MAIT : Lymphocytes T associés aux muqueuses (Mucosal Associated Invariant T)

MAP3K7 : Mitogen-Activated Protein Kinase 7

MBP : Protéine basique de la myéline (Myelin Basic Protein)

MCAM : Melanoma Cell Adhesion Molecule

Melan-A ou MART-1: melanoma antigen recognized by T cells 1

MOG : Glycoprotéine de la myéline et des oligodendrocytes (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein)

mTEC : Cellules Epithéliales Thymiques médullaires

MYH9 : Chaîne lourde de myosine non musculaire 9

nTregs : LT régulateurs naturels

ORF : cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame)

PBMC : Cellules mononucléées périphériques du sang (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PD-1 : Programmed cell Death 1

PHA : Phytohémagglutinine

PLP : Protéine protéolipidique (ProteoLipid Protein)

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PSA1 : Sous-unité alpha 1 du protéasome C2

PSGL1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1

RAG : Gène activant la recombinaison (Recombination Activation Genes)

Régions V/D/J/C : Régions Variable/de Diversité/de Jonction/Constante

RLA : Sous-unité de la tige latérale aux protéines ribosomales P2

RLA : Sous-unité de la tige latérale aux protéines ribosomales P2

ROK : Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène

ROR γ T : Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor Gamma T

RR : récurrente-rémittente

RSS : Séquences Signal de Recombinaison

SEP : Sclérose En Plaques

SNC : Système Nerveux Central

SP : Simple Positif

TAK1 : TGF-beta Activated Kinase 1

TEMRA : Terminally Effector Memory 45RA⁺

TCR : Récepteur de Cellule T

TGF : Facteur de croissance transformant (Transforming Growth Factor)

TLR : Récepteurs des Toll-Like (Toll-Like Réceptors)

TNF : Facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)

VIME : Vimentine

INTRODUCTION

I. La Sclérose en plaques

1. Définition

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire démyélinisante chronique du système nerveux central (SNC) touchant 2 millions de personnes dans le monde dont environ 100 000 en France. Cette maladie se manifeste typiquement chez les jeunes adultes entre 20 et 40 ans et représente la première cause de handicap non traumatique. Elle touche préférentiellement les femmes, avec un sex-ratio de 3 femmes pour 1 homme (Leray et al., 2016). Les symptômes sont très variables, et se traduisent le plus souvent par des atteintes motrices (p. ex., paralysie ou faiblesse musculaire), sensorielles (p. ex., trouble de la sensibilité, fourmillements, picotements), visuelles ou même cognitives (p. ex., trouble de la mémoire ou du langage) (Compston and Coles, 2008).

Elle obéit à des critères diagnostiques consensuels récemment révisés pour tenir compte de l'avancée des techniques médicales (Critères de MacDonald Révisé en 2010) (Polman et al., 2005, 2011). En début de maladie, la majorité des patients (85%) présente une forme récurrente-rémittente (RR) de SEP, caractérisée par des poussées de handicap suivies de rémissions. La phase rémittente semble correspondre à une phase précoce dans le développement de la maladie, comparativement à la phase secondairement progressive. En effet, 50% (Fromont et al., 2010) des patients ayant une forme rémittente évoluent vers une forme secondairement progressive en 20 ans en moyenne (Confavreux et al., 2000). Pour environ 15 % des patients, la maladie est primitivement progressive (PP), avec un handicap présent dès le début de la maladie et qui s'accumule ensuite progressivement en l'absence de phénomènes inflammatoires surajoutés (Compston and Coles, 2008; Nylander and Hafler, 2012) (figure 1).

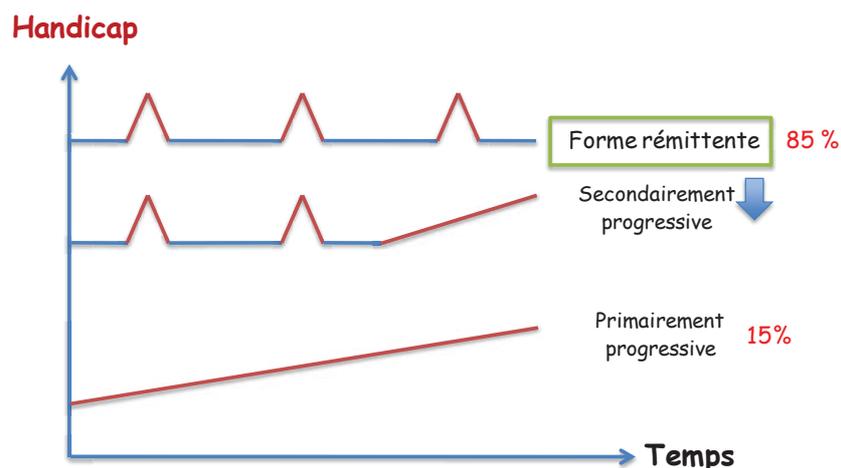


Figure 1: Les différentes formes d'évolution de la SEP. La SEP est une pathologie pouvant se développer sous plusieurs formes. Pour 85% des cas, la maladie débute sous une forme rémittente, se manifestant par des poussées (apparition du handicap) puis des rémissions. Ensuite, pour plus de 50% des cas, la maladie évolue vers une forme secondairement progressive, dans laquelle le handicap s'accumule sans période de rémission. Pour finir, 15% des cas développent initialement une forme primairement progressive (PP), ou le handicap s'accumule dès le début. (Nicol,B (2016) p4)

Malgré des progrès significatifs dans la prise en charge thérapeutique de la SEP, les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la maladie restent mal connus. On sait cependant que la maladie se caractérise par l'apparition de plaques de démyélinisation au sein de la substance blanche, responsables d'une altération de la conduction nerveuse. Une dégénérescence axonale peut aussi survenir de manière secondaire. Ces plaques sont caractérisées par la présence d'un infiltrat de cellules immunitaires essentiellement composé de macrophages et dans une moindre mesure de lymphocytes T (Compston and Coles, 2008a).

2. Epidémiologie de la SEP

La distribution de la SEP est très hétérogène dans le monde, y compris au sein d'un même pays. Dans l'hémisphère nord, la prévalence diminue selon un gradient nord-sud. En Afrique, Asie (excepté au Japon) et Amérique du Sud, la prévalence est faible (Kurtzke, 1975; Melcon et al., 2014). En France, la prévalence (estimée à 94.7/100 000 en 2014) est considérée comme moyenne à élevée, avec des valeurs de prévalence et d'incidence plus élevées dans

le Nord-Est (Fromont et al., 2010). Ces variations géographiques semblent être liées à des facteurs environnementaux et génétiques.

3. Etiologie de la SEP

L'étiologie de la SEP reste mal connue, mais la maladie semble se développer sous l'influence de facteurs environnementaux associés à un terrain génétique prédisposant.

3.1 Facteurs génétiques

Des études épidémiologiques familiales ont montré une susceptibilité génétique. Ainsi, le risque de contracter une SEP pour un jumeau monozygote dont le jumeau est déjà atteint est de 30% et ce risque diminue à 7% pour des jumeaux dizygotes et moins de 5% pour des frères et sœurs (Oksenberg and Baranzini, 2010). De nombreuses études génétiques ont mis en évidence un lien entre la SEP et un allèle du gène codant pour la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), DRB1-15 :01 ou DR2 (Gourraud et al., 2012). C'est un des premiers gènes à avoir été mis en évidence comme facteur de risque de développer une SEP. Récemment, plus d'une centaine de gènes ont été décrits comme associés à la survenue de la maladie, la grande majorité codant pour des molécules impliquées dans le fonctionnement du système immunitaire (Sawcer et al., 2014). L'interaction de différents variants à risque pourrait aussi avoir un impact sur le développement de la maladie. Dans les gènes associés à la réponse immunitaire, on retrouve notamment les gènes codant les chaînes α des récepteurs à l'IL-7 et à l'IL-2, ainsi que le CD58 (LFA3). Enfin, certains variants du CMH-I, comme le HLA-0201, semblent plutôt associés à un effet protecteur (De Jager et al., 2009; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2007).

3.2 Facteurs environnementaux

A ce jour, aucun facteur environnemental précis n'a été incriminé de façon directe dans la survenue de la SEP. Les prévalences et incidences élevées de la SEP dans les pays développés par rapport aux pays sous-développés ont conduit à l'hypothèse "hygiéniste" : dans les pays

développés, le système immunitaire rencontre moins ou du moins plus tardivement des agents infectieux, et aurait donc une propension plus élevée à développer des maladies auto-immunes (Compston and Coles, 2008a; Laplaud and Confavreux, 2006). L'association entre les agents infectieux, notamment le virus Epstein-Barr (EBV), et la SEP a fait l'objet de nombreuses études. Bien qu'un lien de causalité n'ait pas été démontré entre l'infection à l'EBV et la maladie, la présence quasi-constante d'anticorps anti-EBV et les signes de réactivation du virus chez les patients SEP renforcent l'idée d'une implication du virus dans la pathologie (Compston and Coles, 2008a). La carence en vitamine D, liée à une faible exposition au soleil, semble aussi être associée à un risque augmenté de développer une SEP (Pierrot-Deseilligny and Souberbielle, 2010). Il existe ainsi une corrélation inverse entre le niveau sérique de vitamine D et l'activité clinique de la SEP (Soilu-Hänninen et al., 2008). L'obésité dans l'enfance et l'adolescence, et la consommation de sel ou le tabac sont aussi des facteurs de risques décrits (Farez et al., 2015; Hedström et al., 2015; Munger et al., 2013).

4. La SEP, maladie auto-immune

Il est communément admis que la SEP est une maladie auto-immune. Les premiers arguments de cette théorie ont été apportés par les modèles animaux d'Encephalomyélite Autoimmune Expérimentale (EAE). Les toutes premières études chez le singe ont montré que lorsque l'on y injecte des extraits de cerveau de lapin on observe une infiltration de cellules immunitaires et une démyélinisation périvasculaire (Rivers et al., 1933). Par la suite, les différents modèles chez le rongeur ont prouvé que l'on peut induire activement l'EAE par injection d'épitopes de la myéline ou passivement par injection de Lymphocytes T (LT) réactifs contre ces mêmes épitopes (Lassmann, 2007). Sur le plan neuropathologique, il est retrouvé au sein des lésions de SEP des infiltrats de cellules immunitaires en particulier de macrophages et de lymphocytes (Compston and Coles, 2008b). Autre argument fort, les traitements actuels consistent majoritairement en des traitements immunomodulateurs ou immunosuppresseurs. Un large panel de traitements est actuellement utilisé, dont le choix dépend de l'évolution et de l'agressivité de la maladie. De façon générale, les traitements actuels ont une action assez globale sur l'immunité, par exemple la Mitoxantrone (inhibe la

synthèse et la réparation de l'ADN par blocage de la topoisomérase de type II)(Martinelli Boneschi et al., 2013) ou encore le Fingolimod (retient les lymphocytes dans les ganglions lymphatiques)(Kappos et al., 2010). Ces traitements bien qu'efficaces engendrent de nombreux effets secondaires plus ou moins sévères, allant de la diarrhée à la Leucoencéphalopathie Multifocale Progressive (LEMP), cette dernière étant associée à l'utilisation du Natalizumab (traitement ciblant l'intégrine $\alpha 4\beta 1$)(Miller et al., 2003). L'enjeu actuel est par conséquent d'identifier et de cibler spécifiquement des molécules et acteurs immunitaires impliqués dans la maladie, permettant ainsi d'éviter ou de réduire les effets secondaires et d'augmenter l'efficacité thérapeutique.

II. Les lymphocytes impliqués dans la SEP

Les systèmes immunitaires innés et adaptatifs semblent jouer des rôles importants dans l'initiation et la progression de la maladie. Ici, je vous détaillerai seulement les cellules de l'immunité adaptative et en particulier les LT CD8⁺.

1. Les lymphocytes B

L'implication des lymphocytes B (LB) a longtemps été sous-estimée dans les études sur la SEP, toutefois, de plus en plus d'études montrent le(s) rôle(s) non négligeable(s) qu'ils possèdent. Nous savons que plus de 90% des patients SEP présentent des bandes oligoclonales d'Immunoglobuline G dans leur liquide céphalo rachidien (LCR), témoignant d'une réponse immunitaire humorale intrathécale. De plus, les LB et les anticorps sont présents au sein du SNC dans les lésions actives et aux marges des lésions chroniques actives (Meier et al., 2012). Enfin, la déplétion des LB par des anticorps monoclonaux anti-CD20, comme le Rituximab et plus récemment l'Ocrelizumab, sont efficaces pour réduire le nombre de poussée et l'activité lésionnelle (mesurée par IRM) (Hauser et al., 2008). En plus de la fonction de sécrétion d'anticorps, les LB sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes (Harp et al., 2008). Une étude a montré que les LB mémoires de patients pouvaient induire une prolifération et une production d'interféron gamma (IFN γ) par les LT CD4⁺ en réponse à une stimulation par des antigènes (Ag) de la myéline (Molnarfi et al.,

2013). Ils peuvent également produire des cytokines et chémokines, modulant ainsi la réponse et le recrutement des LT (Pierson et al., 2014).

2. Les Lymphocytes T CD4⁺

La SEP est décrite comme médiée principalement par les LT CD4⁺, notamment grâce aux études sur l'EAE. Certains variants du CMH-II ont été fortement associés à la maladie, en particulier HLADRB1*15:01. Les LT helper impliqués dans la maladie vont jouer un rôle crucial notamment via la sécrétion de GM-CSF qui va entraîner l'attraction et l'activation de cellules pro-inflammatoires (Becher et al., 2017). Différentes études montrent que les sous-populations de LT CD4⁺ impliquées plus particulièrement dans la SEP sont les Th1 et Th17.

Les LT CD4⁺ Th1 sont des lymphocytes dont la polarisation est médiée par l'IL-12 et produisent en particulier de l'IL-2 et de l'IFN γ . Dans l'EAE, l'immunisation par des épitopes de la myéline entraîne la mise en place d'une réponse Th1, mise en évidence par la présence de LT producteurs d'IFN γ et d'IL-2 dans les lésions (Goverman, 2009). Chez l'homme, l'injection d'IFN γ exacerbe la maladie (Panitch et al., 1987). De plus, on retrouve de l'IL-2 dans le LCR et le SNC des patients. La présence de cette cytokine semble même corrélée avec l'activité clinique de la maladie (Lovett-Racke et al., 2011; Windhagen et al., 1995).

Les LT CD4⁺ Th17 sont définis par l'expression du facteur de transcription ROR γ T et par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22 ou encore l'IL-26 (Stockinger et al., 2007). Chez l'homme, le nombre de cellules exprimant l'ARN messager ou la protéine IL-17, est augmentée dans le sang et dans le LCR des patients, d'autant plus durant les phases actives de la maladie (Durelli et al., 2009). Après stimulation *in vitro* des cellules du sang, la fréquence des Th17 est aussi plus importante chez les patients que chez les témoins (Wang et al., 2011). Il faut noter que parmi les traitements utilisés couramment dans la SEP, le Fingolimod entraînerait une baisse des Th17 circulants et l'IFN β augmenterait leur sensibilité à l'apoptose (Durelli et al., 2009; Mehling et al., 2010). Des essais ciblant plus précisément la voie Th17 sont actuellement en cours dans la SEP. Un essai clinique de phase II a été effectué, utilisant un anticorps monoclonal anti-IL-17A neutralisant (Secukinumab) chez des patients RR. Cette étude a montré une efficacité dans la réduction de l'activité

lésionnelle des patients traités (Havrdová et al., 2016). Les autres populations de LT CD4⁺Th sont impliqués de manière variable. La figure 2 résume ces données.

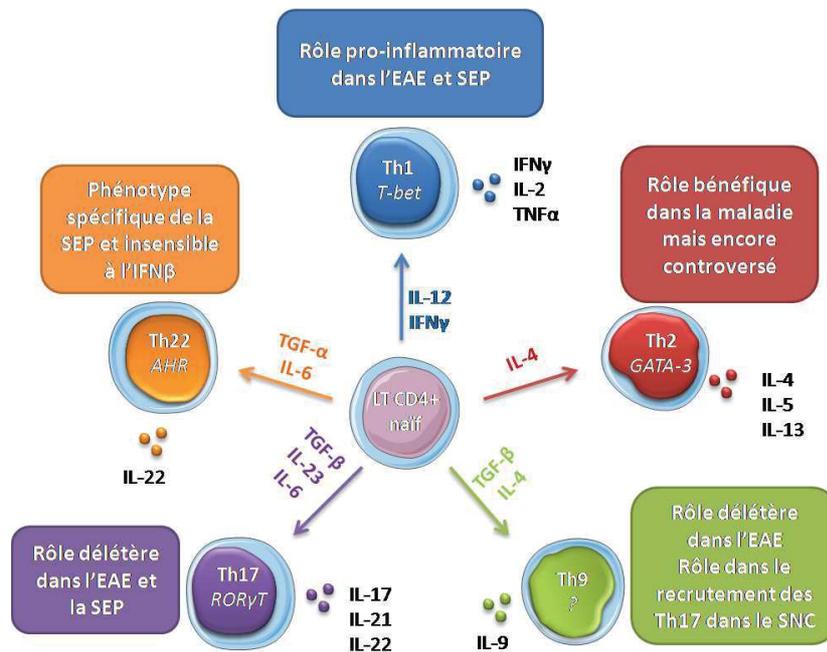


Figure 2 : Différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LT helper et leur implication dans la SEP. Les LT CD4⁺ se différencient en divers sous types appelés auxiliaires (helper), selon les cytokines présentes. Cette plasticité cellulaire permet aux LT CD4⁺ d'exercer diverses fonctions dans la SEP et son modèle animal, l'EAE. (Nicol, B (2016) p16. Implication des lymphocytes TCD8⁺ exprimant l'antigène CD161 dans la physiopathologie de la sclérose en plaques. Thèse de Doctorat Universitaire de Nantes)

3. Les lymphocytes T CD8⁺

Les LT CD4⁺ furent les premiers à être impliqués dans la maladie, mais de plus en plus d'études suggèrent un rôle tout aussi important des LT CD8⁺. En effet, par leurs effets cytotoxiques, ils semblent mieux armés que les LT CD4⁺ pour induire directement des lésions au sein du SNC. Un des arguments majeurs de cette implication est leur prédominance au sein des lésions de SEP. Chez l'homme, les LT CD8⁺ sont retrouvés au sein des lésions de SEP en plus grande proportion que les LT CD4⁺ et indépendamment de la durée et de l'évolution de la maladie ainsi que de la thérapeutique utilisée (Babbe et al., 2000a; Booss et al., 1983; Hauser et al., 1986). Notre équipe a aussi réalisé une étude quantitative des LT CD8⁺ au sein de 22 lésions provenant de 3 patients issus de notre banque locale. Nous avons observé une

prédominance des LT CD8⁺ parmi les LT totaux (Salou et al., 2015a). De façon plus nuancée, certaines études suggèrent que les LT CD8⁺ sont enrichis préférentiellement au sein des zones parenchymateuses alors que les LT CD4⁺ sont plutôt retrouvés dans les zones périvasculaires (Tzartos et al., 2008).

3.1 Les LT CD8⁺ dans le SNC

Ces LT CD8⁺ infiltrants ont une répartition oligoclonale, et les mêmes clones peuvent être retrouvés dans différents endroits du cerveau (Babbe et al., 2000b; Montes et al., 2009; Salou et al., 2015a). Certains de ces clones portent des mutations silencieuses (Junker et al., 2007). Toutes ces données évoquent une sélection dépendante de l'Ag et suggèrent l'implication de ces clones CD8⁺ dans la maladie. L'expression du CMH-I à la surface cellulaire est nécessaire à la présentation antigénique et l'activation des LT CD8⁺ afin que ces derniers puissent exercer leur rôle pro-inflammatoire ou régulateur. Dans le SNC de patients atteints de SEP, les astrocytes, les oligodendrocytes, les neurones et les axones surexpriment le CMH-I en fonction de l'activité de la maladie et des lésions, ce qui en font des cibles potentielles pour la lyse par les LT CD8⁺ (Höftberger et al., 2004). Cette lyse peut être médiée par différents mécanismes : sécrétion de granules cytotoxiques ou de cytokines comme le *tumor necrosis factor* (TNF) α , mécanismes dépendants de Fas (Sauer et al., 2013). Il a été montré *in vitro*, dans un modèle murin, que la transection axonale en condition démyélinisante pouvait être réalisée par les LT CD8⁺ cytotoxiques (Medana et al., 2001). Chez l'homme, il existe une corrélation positive entre les dommages axonaux au sein de lésions et le nombre de LT CD8⁺, ce qui n'est pas le cas pour les LT CD4⁺ (Bitsch et al., 2000). La capacité cytotoxique des LT CD8⁺ fait de ces cellules de très bons candidats pour réaliser des dommages au sein du cerveau. Plusieurs études, dont la nôtre, ont mis en évidence leur capacité à sécréter du granzyme B et de l'IFN γ *in situ* (Ifergan et al. 2011; Annibali et al. 2011; Salou et al. 2015).

3.2 Les LT CD8⁺ dans le LCR

Des LT CD8⁺ oligoclonaux sont aussi retrouvés dans le LCR de patients SEP (Jacobsen et al., 2002). On observe un enrichissement des LT CD8⁺ sécréteurs de granzyme B dans le LCR

(Jacobsen et al. 2002). Le taux de granzyme A et B dans le LCR est augmenté chez les patients en poussée comparativement à ceux en rémission ou aux contrôles (Malmeström et al., 2008). Il est très intéressant de souligner que, dans un modèle de transmigration *in vitro*, la fraction transmigrée est enrichie en LT CD8⁺ effecteurs mémoires et d'autant plus ceux exprimant du granzyme B, de l'IFN γ et de l'IL-17 (Ifergan et al., 2011a).

3.3 La migration des LT CD8⁺ dans le SNC

Il a toujours été admis que le cerveau est un organe immuno-privilegié, c'est pourquoi les mécanismes permettant la migration des LT CD8⁺ dans le SNC restent encore obscurs. Cependant des vaisseaux lymphatiques irrigants le cerveau viennent d'être découverts et pourraient aider dans la compréhension de ces mécanismes (Louveau et al., 2015). Plusieurs équipes ont étudié cette migration dans l'EAE, permettant de décrire des nouvelles molécules potentiellement impliquées dans la maladie. Par exemple, le blocage de l'intégrine α 4 (CD49d) chez des souris EAE immunisées avec la MOG35-55 permet de diminuer le nombre de LT CD8⁺ infiltrant le SNC et de diminuer le score de gravité de la maladie. Cet effet est aussi retrouvé pour les LT CD4⁺ (Ifergan et al., 2011b). Cette molécule est la cible d'un traitement actuel dans la SEP appelé Natalizumab (ciblant l'intégrine α 4 β 1). Récemment, une équipe a caractérisé la molécule « mélanoma cell adhesion molecule » (MCAM) comme potentiellement impliquée dans la maladie (Larochelle et al., 2015). De façon intéressante, l'expression de MCAM est augmentée chez les LT CD8⁺ des patients SEP RR en poussées comparativement aux témoins. L'expression de cette molécule est associée à un phénotype sécrétant de l'IFN γ et de l'IL-17 chez ces LT CD8⁺. Depuis la mise en évidence de nouvelles molécules clés impliquées dans la transmigration cellulaire, celle-ci est un axe majeur de recherche.

3.1 Les sous-populations de LT CD8⁺

Les LT CD8⁺ Tc1 sont décrits comme producteurs de cytokines de type 1 comme l'IFN γ et le TNF α . Dans la SEP, les LT CD8⁺ spécifiques de la MBP (*Myelin Basic Protein*) sont capables de produire ces cytokines quand ces derniers sont mis en contact avec des oligodendrocytes

compatibles via leur CMH mais il semble que ce soit aussi le cas chez les témoins (Jurewicz et al., 1998).

Les LT CD8⁺ Tc17 sont caractérisés par la production d'IL-17 et ont été mis récemment en évidence dans les maladies auto-immunes. Après stimulation *in vitro*, il a été montré que le sang des patients SEP contenait plus de LT CD8⁺ IL-17⁺ que le sang de témoins (Wang et al., 2011).

Plusieurs équipes, dont la notre, ont exploré l'implication des cellules MAIT (*mucosal associated invariant T cell*) dans la SEP. Ces LT sont CD8⁺CD161^{high}, avec un phénotype effecteur mémoire (Salou et al., 2016). Les cellules MAIT ont la particularité de posséder un TCR semi-invariant (chaîne Vα7.2 invariante et une chaîne Vβ préférentiellement Vβ2, Vβ13 ou Vβ22) qui leur confère une spécificité antigénique microbienne restreinte par activation via la molécule de CMH-I non classique MR1 (*MHC class-I-related protein 1*) (Tilloy et al., 1999). Les résultats de différentes études dans la SEP sont très contradictoires, une étude a montré l'augmentation des cellules MAIT dans le sang (Annibali et al., 2011) et une autre l'inverse (Miyazaki et al., 2011). Dans notre étude nous avons montré qu'il y a une diminution non significative de la fréquence de ces cellules dans le sang des patients SEP (Salou et al., 2016). Nous avons également essayé d'identifier ces cellules au sein du SNC et n'avons retrouvé ces cellules MAIT qu'à seulement 0,5% des LT dans les lésions comparativement à 1-10% observés dans le sang. Cela suggère que les cellules MAIT ont probablement un rôle accessoire dans la neuro-inflammation liée à la SEP.

A ce jour, peu d'études ont analysé le phénotype des LT CD8⁺ dans les lésions. L'une d'entre elle montre que 80% des LT CD8⁺ produisent de l'IL-17 (Tzartos et al., 2008). Nous avons de notre côté continué à étudier les LT CD8⁺ mais cette fois non MAIT. Notre étude sur les LT CD8⁺CD161^{int} est la première qui caractérise spécifiquement une population de LT CD8⁺ avec des propriétés neuropathogéniques dans la SEP (expression de molécules de migration tissulaire, capacité de transmigration augmentée par rapport aux CD161^{high} et CD161^{neg}, présence et phénotype pro-inflammatoire *in situ*). Toutes ces données suggère une implication de cette sous-population de LT CD8⁺ dans la physiopathologie de la SEP (Nicol et al, en soumission, 2017).

III. Les lymphocytes T autoréactifs

Les études précédentes partent de l'hypothèse d'une reconnaissance et d'un dommage du soi par ces LT autoréactifs. Cependant, malgré de nombreux essais, leur spécificité antigénique reste inconnue. Cette donnée est cruciale pour la compréhension de l'implication de ces cellules dans la maladie, c'est pourquoi de nombreuses équipes ont étudié le répertoire des LT. L'étude du répertoire est l'analyse des récepteurs des LT, appelés TCR (T Cell-Receptor), qui permettent la reconnaissance des antigènes présentés par les molécules CMH de classe I ($CD8^+$) ou de classe II ($CD4^+$). Les LT peuvent être polyclonaux (répertoire étendu) ou invariants (répertoire limité). Au sein des LT polyclonaux se trouvent des LT autoréactifs ou autoagressifs, dont l'activation est délétère.

1. Le TCR

Le TCR est un hétérodimère, constitué d'une chaîne α et β (figure 3). Chacune de ces chaînes est constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable, au sein duquel existent des régions hypervariables, appelées *Complementarity Determining Regions* (CDR). La région CDR3, impliquée dans la reconnaissance antigénique, concentre l'essentiel de la diversité du TCR. Elle résulte de la recombinaison aléatoire des différents segments de gènes V (Variable), D (Divers), J (Jonction) et C (Constant), et de l'insertion ou de la délétion de nucléotides entre ces différents segments de gènes.

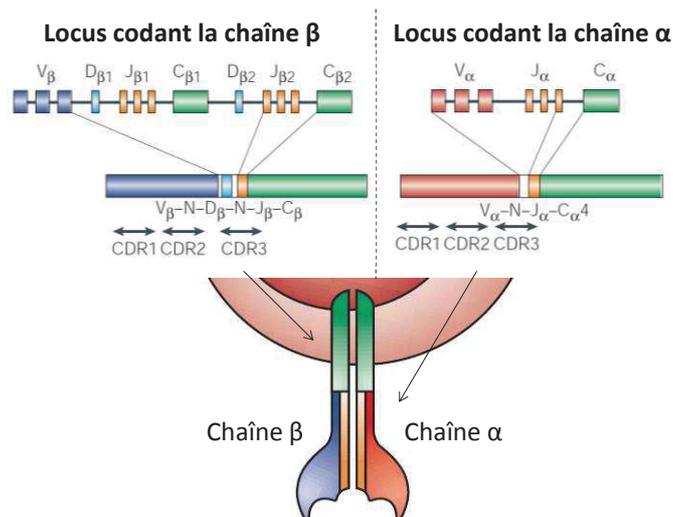


Figure 3 : Organisation des loci codant les chaînes du TCR et structure du TCR. Le TCR est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β , réarrangées au niveau génomique. Chaque chaîne est constituée d'une région constante (vert) et d'une région variable (bleu/orange et rouge/orange). D'après (Nikolich-Zugich et al., 2004).

Le réarrangement aléatoire de ces différents segments mène à la génération d'une chaîne α (VJ) et d'une chaîne β (VDJ) au cours du développement thymique. Chez l'homme, il existe 54 gènes $V\alpha$, 61 $J\alpha$ et 1 $C\alpha$ ainsi que 64-67 $V\beta$, 2 $D\beta$, 14 $J\beta$ et 2 $C\beta$ (Lefranc et al., 2009). La recombinaison s'effectue par les enzymes de recombinaison RAG-1 et RAG-2 (*Recombination Activation Genes*) grâce aux séquences signal de recombinaison (RSS). Lors de ce processus, des nucléotides peuvent être ajoutés. La région hypervariable CDR3 ainsi créée est cruciale dans la reconnaissance de l'Ag. Cette variabilité de génération des chaînes, associée à la variabilité d'appariement entre les chaînes α et β produit théoriquement plus de 10^{15} LT différents (Davis and Bjorkman, 1988; Sewell, 2012). Ces LT peuvent reconnaître la grande majorité d'Ag étrangers présentés.

2. Les mécanismes de tolérance

Toutes les recombinaisons possibles ne mènent cependant pas à la génération d'un LT fonctionnel. En effet, il faut que ces TCR soient capables de reconnaître un Ag présenté dans le contexte du CMH. De plus, la génération aléatoire des TCR implique une reconnaissance potentielle à la fois d'Ag étrangers et du soi. Dans le thymus, des mécanismes permettent la génération d'un répertoire T capable de reconnaître une quantité potentiellement infinie d'Ag étrangers, sans pour autant (théoriquement) reconnaître d'Ag du soi. C'est pourquoi des mécanismes de tolérance centrale et périphérique sont mis en place. Seulement 2 à 5% des précurseurs T à l'entrée du thymus recirculent en périphérie. Parmi ces LT, un certain degré d'auto-réactivité subsiste encore. Ces LT reconnaissent des complexes CMH-peptides avec des affinités assez faibles ou sont spécifiques de peptides présents en trop faible quantité dans le thymus. Des mécanismes sont en place en périphérie pour éviter le développement de pathologies auto-immunes (Chatenoud and Bach, 2002). La figure 4 résume tous ces mécanismes centraux et périphériques mis en place.

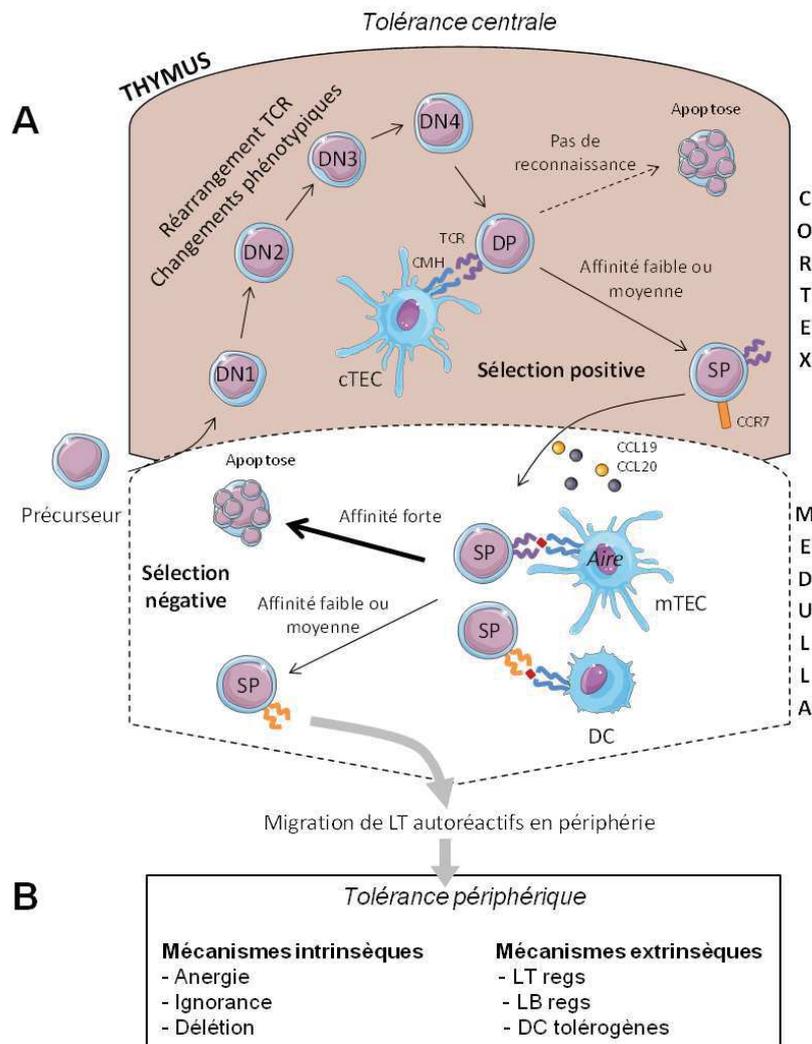


Figure 4 : Mécanismes de tolérance centrale et périphérique. **A.** Dans le cortex thymique, les thymocytes DP reconnaissant des CMH du soi avec une affinité faible échappent à la mort par négligence, c'est la sélection positive. Ils migrent ensuite dans la médulla, au sein de laquelle la reconnaissance d'un complexe CMH-peptide du soi avec une affinité forte entraîne leur apoptose, c'est la sélection négative. Certains LT autoréactifs échappent à la tolérance centrale et migrent en périphérie. **B.** Anergie : En l'absence d'un co-engagement avec les molécules de co-stimulations, le complexe CMH-peptide seul, bloque la stimulation des LT autoréactifs. Ignorance : Séparation physique entre le LT autoréactif et le tissu qui contient son Ag. Délétion : l'AICD (*activation-induced cell death*) limite l'engagement répété des LT autoréactifs. Mécanismes extrinsèques : Mécanismes médiés par d'autres types cellulaires qui permettent d'inhiber l'activation des LT autoréactifs. DN : double négatif, DP : double positif, SP : simple positif. (Salou, M., (2014) p19)

3. L'activation des LT autoréactifs dans la SEP

Dans les maladies auto-immunes dont fait partie la SEP des LT autoréactifs semblent échapper à tous ces mécanismes en raison d'une affinité relativement faible pour le complexe CMH-peptide. Des études structurales du complexe synapse immune de LT autoréactifs reconnaissant un peptide de la myéline MBP, ont montré une reconnaissance

sous-optimale comparé aux LT reconnaissant des peptides étrangers (Yin et al., 2012). Comparé à une synapse immune classique, les molécules de TCR s'accumulent alors qu'il y a moins de CMH présentant l'auto-antigène. Cette particularité, associée à une perturbation de la motilité, entraîne un taux lent de liaison TCR-CMH mais une plus forte réponse. Ces caractéristiques inhabituelles de la synapse immune permettrait l'évasion de la sélection négative (Schubert et al., 2012). Cette évasion pourrait également s'expliquer par le fait que les LT de faible affinité ne seraient activés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qu'au niveau de l'organe cible et non pas au niveau du thymus (Klein et al., 2000). L'altération du peptide par des modifications post-traductionnelles pourraient aussi permettre d'augmenter l'affinité du TCR (Wucherpfennig and Sethi, 2011; Yin et al., 2012). La réactivité croisée, les superantigènes, la présence de deux TCR ou un défaut de régulation périphérique constituent aussi des pistes pour expliquer l'activation de ces LT autoréactifs (Salou et al., 2013). Certains de ces mécanismes sont schématisés dans la figure 5 et détaillés par la suite.

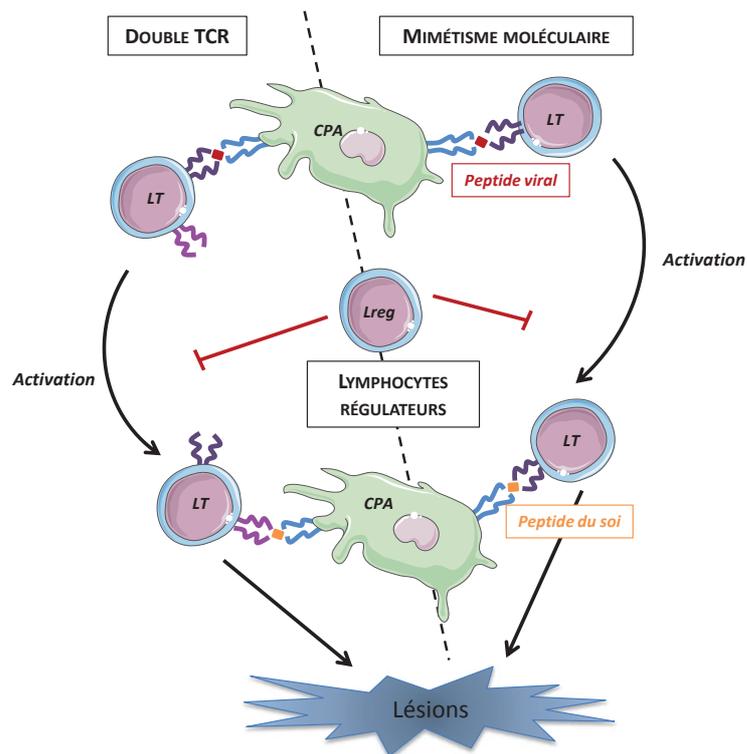


Figure 5 : Mécanismes possibles d'activation périphérique de cellules potentiellement autoréactives. Différents mécanismes ont été proposés pour l'activation de LT autoréactifs en périphérie. La première est celle du double TCR, c'est-à-dire que certains LT pourraient porter deux TCR, l'un reconnaissant un peptide viral, et l'autre un épitope de la myéline. La deuxième est celle du mimétisme moléculaire, à savoir que le TCR porté par la cellule pourrait reconnaître deux épitopes proches. Enfin, il a aussi été proposé un défaut de régulation des cellules potentiellement autoréactives. (Salou et al., 2013)

3.1 Le mimétisme moléculaire

Chez les patients SEP, mais aussi chez les volontaires sains, le mimétisme moléculaire est encore controversé. Certains clones lymphocytaires spécifiques de la protéine de la myéline peuvent être activés en présence de peptides dérivés de différents virus dont l'EBV (Boucher et al., 2007). Cependant ces résultats ne sont pas retrouvés dans d'autres études (Lindsey and Hatfield, 2010). Il n'est pas évident de savoir si cette réactivité est spécifique seulement chez les patients.

3.2 Les doubles TCR

L'existence de LT portant deux chaînes α fonctionnelles chez l'homme et la souris a été démontrée. Ils représentent jusqu'à 30 % chez l'homme et 15 % chez la souris (Corthay et al., 2001). D'autres LT portant deux chaînes β ont aussi été mis en évidence, où ils représentent environ 1% chez l'homme et 6% chez la souris (Davodeau et al., 1995) mais la fonctionnalité de ces TCR est très difficilement vérifiable. Il semblerait qu'une majorité de ces clones avec un double TCR soit non fonctionnelle mais pour 5% d'entre eux ils présentent une affinité forte pour des Ag du soi normalement tolérés (Kekäläinen et al., 2010). Chez l'homme, des LT portant deux TCR (une chaîne β et deux chaînes α) ont été identifiés comme surreprésentés dans des lésions de SEP (Kim et al. 2012).

3.3 Les superantigènes

L'hypothèse de superantigènes, pouvant se lier à la fois au CMH et au TCR et qui entraineraient la prolifération et la sécrétion de cytokines par les LT, peut aussi être évoquée (Libbey et al., 2014). Ils seraient en fait spécifiques des toxines protéiques comme par exemple l'entérotoxine staphylococcique A et B. Ces toxines ont été montrées comme responsables de la réapparition de poussées dans l'EAE par stimulation de LT spécifiques de la MBP (Soos et al., 2002). Ces toxines ont également été associées à des périodes de poussées chez les patients SEP (Mulvey et al., 2011).

3.4 Glissement d'épitope et activation non spécifique

Lors de l'inflammation et de la destruction d'un tissu dû à des LT autoréactifs, il y a libération d'Ag, ce qui peut entraîner de nouvelles réponses autoréactives. C'est ce qu'on appelle le phénomène de glissement d'épitope ou *epitope spreading*. Cela entraîne la mise en place de réponses contre d'autres épitopes du soi différents de l'épitope initiateur. Ces nouveaux Ag peuvent soit être issus de la protéine initiatrice, soit d'autres protéines. L'inflammation va permettre la disponibilité de ces Ag qui en situation d'homéostasie ne sont pas accessibles. Par exemple, chez les patients SEP, les LT CD8⁺ reconnaissant des Ag apoptotiques semblent augmentés dans le sang et s'accumulent dans le LCR en corrélation avec l'activité clinique de la maladie. Ce phénomène induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ et l'IL-17, pourrait amplifier et maintenir la réponse délétère dans la SEP (Lolli et al., 2013). Il peut également y avoir une activation non spécifique, appelée aussi activation *bystander*, de LT non spécifiques sur le site de l'inflammation.

4. L'étude du répertoire

4.1 Les outils pour l'étude du répertoire

Lors d'une reconnaissance antigénique, le LT portant le TCR spécifique de l'antigène prolifère, et devient un clone prédominant au sein d'une famille V β . Une longueur de CDR3 est alors surreprésentée, et le répertoire comporte des altérations d'allure mono ou oligoclonale. Au contraire, en condition de repos, la répartition des longueurs de CDR3 au sein d'une famille V β a un aspect gaussien, toutes les longueurs étant représentées.

Le *CDR3 spectratyping* est une technique qui permet d'étudier le répertoire privé de tout individu et donc d'étudier toute la diversité des CDR3, à travers l'étude de la répartition de leurs longueurs sur des familles V β définies (Puisieux et al., 1994). Cette technique est basée sur une amplification spécifique à l'aide d'amorces correspondant aux différentes familles V β permettant ensuite de visualiser la répartition clonale de chaque famille en fonction de la longueur des CDR3.

Le CDR3 spectratyping est maintenant remplacé par des techniques à haute résolution comme le *Next generation sequencing* qui permet d'étudier toutes les séquences sans

sélection particulière de familles V β . Cet outil permet d'augmenter considérablement la quantité de séquences analysées au sein d'un même échantillon et surtout de connaître quantitativement la fréquences de chaque clone au sein d'une même famille et dans la totalité du répertoire. Ces deux techniques sont schématisées dans la figure suivante (Figure 6).

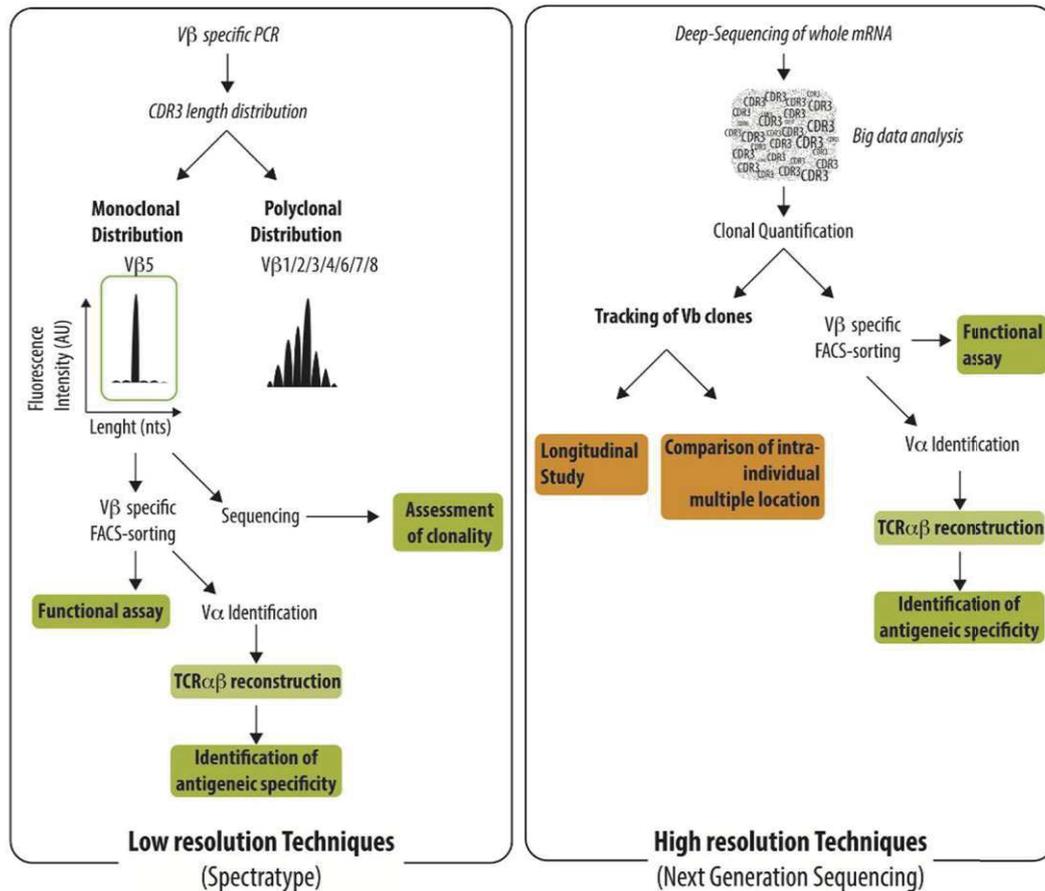


Figure 6 : Caractérisation du TCR V β par technique basse résolution et haute résolution. Les LT portant un TCR spécifique d'un antigène peuvent être identifiés par de techniques à faible résolution (spectratype ou CDR3 spectratyping) ou des techniques à haute résolution (NGS). Les techniques à basse résolution visent à identifier les familles V β qui présentent une distribution monoclonale de leur longueur de CDR3. Distribution étudiée à l'aide de PCR V β spécifiques. La clonalité du V β est confirmée par le séquençage du produit de PCR. La purification spécifique des cellules T permet plus tard d'effectuer un test fonctionnel ou de reconstruire le TCR $\alpha\beta$ afin d'identifier l'antigène reconnu. Le séquençage à haut débit permet d'identifier la séquence de chaque V β via un processus bio-informatique nécessaire pour quantifier l'abondance des différents clones des LT. La quantité de données générées est très importante et est mieux adapté pour suivre les clones de cellules T dans le temps ou sur différents sites anatomiques. (Degauque et al., 2016)

4.2 L'étude du répertoire dans la SEP

L'étude du répertoire dans la SEP est un axe majeur en recherche dans le but d'identifier le ou les antigène(s) impliqué(s) dans la maladie. Différentes études ont observé que le répertoire des LT CD8⁺ dans le sang des patients SEP présente plus d'expansions clonales que ceux des témoins sains (Monteiro et al. 1996; Gran et al. 1998; Muraro et al. 2002; Matsumoto et al. 2003). Notre équipe a montré des résultats identiques et a également démontré chez 35 patients SEP que le répertoire des LT CD8⁺ du sang présente plus d'expansions clonales que celui des LT CD4⁺ (Laplaud et al., 2004). De plus, le répertoire des LT totaux dans le LCR est plus oligoclonal que dans le sang, et plus spécifiquement pour les LT CD8⁺ (Jacobsen et al., 2002; Lozeron et al., 1998; Salou et al., 2015a).

Il est intéressant de prendre en compte que l'expansion clonale est directement corrélée avec l'activité de la maladie. En effet, nous avons observé que le répertoire des LT du sang est plus altéré chez des patients SEP avec une forme active de la maladie que ceux avec une forme inactive (Laplaud et al., 2006).

Plusieurs équipes ont montré que les LT infiltrant le cerveau avaient un répertoire TCR restreint et que ces clones étaient principalement CD8⁺ (Babbe et al, 2000; Junker et al, 2007; Montes et al, 2009). Très récemment, notre équipe a étudié le répertoire des LT dans le sang, le LCR et le SNC de 3 patients SEP par la technique du spectratyping ainsi que du séquençage à haut débit. Nous avons pu comparer ces différents compartiments et nous avons mis en évidence que la majorité des familles oligoclonales du LCR sont retrouvées dans le cerveau (environ 80%). C'est aussi le cas d'environ 40% des LT CD8⁺ du sang et dans une moindre mesure LT CD4⁺. De plus, notre étude montre que chez les patients SEP, les LT CD8⁺ oligoclonaux du sang présentent des caractéristiques phénotypiques suggérant leur implication dans la physiopathologie de la maladie : cellules en majorité mémoires, exprimant plus de CCR5, de CD11a et de granzyme B que les LT appartenant à des familles gaussiennes (Salou et al. 2015) (figure 7 et Annexe 1).

Patient	Technique	Blood CD4 → CNS	Blood CD8 → CNS	CSF → CNS
MS 1	CDR3 spectratyping ¹	30% (3/10)	43% (6/14)	78% (7/9)
	High-throughput sequencing ²	5.0%	27.5%	72.5%
MS 2	CDR3 spectratyping ¹	23% (3/13)	43% (10/23)	70% (14/20)
	High-throughput sequencing ²	7.5%	37.5%	95.0%
MS 3	CDR3 spectratyping ¹	25% (1/4)	23% (3/13)	90% (18/20)
	High-throughput sequencing ²	2.5%	47.5%	ND
Total	CDR3 spectratyping ¹	26.0%	36.0%	79.0%
	High-throughput sequencing ²	5.0%	37.5%	84.0%

CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; MS, multiple sclerosis; CDR3, complementary determining region 3.

¹Number of mono/oligoclonal profiles from the periphery that are similar in at least one lesion (based on the similarity score).

²Percent of the 20 most represented clones in the periphery that are among the 100 most represented clones in the two lesions.

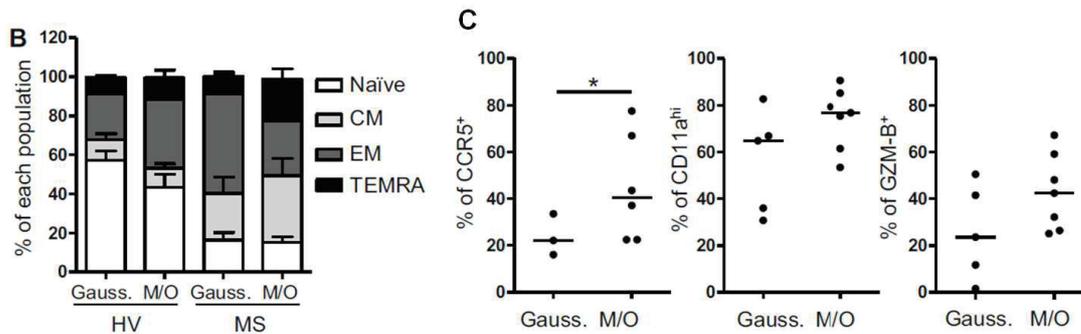


Figure 7 : Similitude des clones du SNC retrouvés en périphérie, qui, pour les LT CD8⁺ en périphérie tendent vers un phénotype mémoires avec des marqueurs de migration et de cytotoxicité. A. Comparaison des clones prédominants des CD4⁺, des CD8⁺ et du LCR par rapport aux altérations du SNC chez 3 patients autopsiés par CD3 spectratyping (nombre de clones similaires) et séquençage à haut débit (Pourcentage des 20 clones les plus fréquents en périphérie parmi les 100 les plus fréquents dans au moins 2 lésions). **B.** Proportion des différents sous-types de LT CD8⁺ en fonction du marquage CD45RA-CCR7 et de leur famille Vβ avec altérations mono/oligoclonal (M/O : HV n=7 et MS n= 7) ou Gaussiennes (Gauss : HV n= 9 et MS n=6). CM : central memory EM : effector memory TEMRA : Terminally Effector Memory RA positive. **C.** Quantification de l'expression du CCR5⁺, CD11a^{High} et Granzyme B des LT CD8⁺ des familles Vβ altérations mono/oligoclonal ou Gaussiennes. Figures complètes (Salou et al., 2015b).

IV. Auto-antigènes impliqués dans la SEP

Dans le but d'identifier les antigènes et les populations cellulaires impliquées dans la SEP, plusieurs équipes ont essayé d'étudier directement la cible antigénique des LT CD8⁺. Cependant, la comparaison entre les études est difficile, dans la mesure où les techniques et les antigènes utilisés sont différents (Elong Ngonu et al., 2012). La réactivité antigénique spécifique des LT CD8⁺ et des LT CD4⁺ chez les patients SEP a été étudiée par une technique adaptée de la cytométrie en flux. Cette étude a montré que la réactivité des LT CD8⁺ envers la protéine basique de la myéline de l'oligodendrocyte (*Myelin-associated oligodendrocyte basic protein*, MOBP) est seulement augmentée chez les patients SEP comparativement aux témoins (Crawford et al., 2004).

Une autre étude a montré que les LT CD8⁺ spécifiques d'épitopes apoptotiques sont surreprésentés chez des patients SEP comparés à des témoins. En réponse à ces antigènes, ces cellules sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ et/ou de l'IL-17 (Lolli et al., 2013). Une autre approche a analysé la prolifération des LT CD8⁺ suite à leur mise en contact avec des PBMC irradiés et incubés avec des peptides dégénérés de la protéine basique de la myéline (Myeline Basic Protein, MBP). Ainsi, ils ont observé que la fréquence de LT CD8⁺ autoréactifs de la MBP est augmentée dans le sang de patients SEP comparés aux témoins (Zang et al., 2004). Cependant, la reconnaissance antigénique reste encore controversée, avec notamment une étude de notre équipe qui n'a montré aucune différence d'auto réactivité entre patients SEP et témoin sains (Berthelot et al., 2008).

Récemment, une étude a montré que KIR4.1, un canal potassique exprimé sur les cellules gliales, était la cible d'auto-anticorps sériques trouvés chez presque la moitié des patients étudiés (Srivastava et al., 2012). Ces données n'ont pas été confirmées, avec seulement 7,5% ou 1% des patients SEP qui présentent ces anticorps dans d'autres études, ce qui n'est pas statistiquement différent des témoins (Brickshawana et al., 2014; Nerrant et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats est en faveur de l'existence de LT CD8⁺ pathogéniques envers le SNC. Cependant, l'identification des antigènes reconnus est encore peu claire, ce qui nécessite de développer d'autres techniques d'identification.

OBJECTIFS

V. Objectifs

Le diagnostic SEP est réalisé suite aux premières manifestations neurologiques mais cela traduit déjà une atteinte lésionnelle importante du SNC. Un des enjeux majeurs dans la recherche sur la SEP est donc de trouver des outils prédictifs permettant de prendre en charge les patients avant même que le handicap ne se déclare. Un des principaux points d'interrogations est de savoir pourquoi et comment des LT autoréactifs s'activent. La spécificité antigénique de ces LT autoréactifs est donc un point clé et particulièrement celle des LT CD8⁺ qui sont probablement directement responsables de la destruction de la myéline.

L'objectif de ce projet a été de mettre en place un système permettant d'identifier et de caractériser le TCR de LT CD8⁺ prédominant au sein d'une famille V β dans le LCR de patients atteints de SEP, pour faire exprimer ces TCR à une lignée d'hybridomes afin d'obtenir un modèle *in vitro* pour tester la reconnaissance antigénique de ces clones. Cette méthode sera basée sur des travaux de l'équipe de Pr Klaus Dornmair avec qui nous collaborons et qui a mis en place une méthode non biaisée d'identification de la cible antigénique de LT CD8⁺ (Siewert et al., 2012). Grâce à notre étude publiée en 2015 (Salou et al. 2015) nous savons que le sang mais surtout le LCR, sont des fenêtres sur les clones présents au sein des lésions dans le SNC. Il est donc maintenant admis qu'en étudiant le LCR nous pouvons étudier une grande partie des clones potentiellement impliqués dans la maladie.

Cette étude se divisera en plusieurs étapes : la première étant la comparaison du repertoire dans le LCR et le sang des patients puis la caractérisation de la chaîne β de LT CD8⁺ prédominants au sein de familles V β . La deuxième étape est l'identification de la chaîne α correspondante. La troisième étape est la création de vecteurs d'expression permettant la création d'un modèle *in vitro* de lignée T murine exprimant le TCR est sécrétant de l'IL-2 si celui-ci est activé. La dernière étape est la recherche de la spécificité antigénique de ces clones.

Il est crucial pour le diagnostic ainsi que pour le traitement de la SEP d'identifier les clones qui pourraient être ceux impliqués dans le déclenchement et le maintien de la SEP.

MATERIELS ET METHODES

VI. Matériels et méthodes

1. Inclusion des patients

La ponction lombaire fait partie des examens utiles pour poser le diagnostic de SEP chez des patients déclarant un premier évènement démyélinisant ou aussi appelé syndrome cliniquement isolé (SCI). C'est le seul moment où le prélèvement de LCR est justifié. Huit patients présentant un premier évènement démyélinisant visible par imagerie par résonance magnétique (IRM) ont été inclus dans cette étude, leur âge variant de 15 ans à 43 ans ($26,6 \pm 10,9$ ans). Ils ont été recrutés dans le service de Neurologie du CHU de Nantes. Pour tous les patients un prélèvement de 100 mL de sang sur EDTA a été réalisé et 10 mL de LCR a été récupéré. Les cellules monoclées du sang périphérique ou *Peripheral Blood Mononuclear cells* (PBMC) sont isolées par gradient de Ficoll (Eurobio) puis congelées en ampoules de 20 millions de PBMC dans l'azote liquide.

Les cellules du LCR ont été, dans la première partie de l'étude du répertoire, divisées en deux : une partie pour de la culture cellulaire et une partie pour de l'extraction d'ARN directement incluses dans un tampon de préservation afin d'effectuer une extraction d'ARNm et une reverse-transcription.

Le diagnostic de SEP a été posé a posteriori en s'accordant aux critères de McDonald (2010). Tous les donneurs ont fourni un consentement éclairé en conformité avec notre comité d'éthique local de l'hôpital. Dans le cas de nos patients sur les 8 inclus dans l'étude, 7 ont été diagnostiqués pour une SEP de forme RR. Pour le dernier, une SEP a été un temps évoquée. Puis son diagnostic s'est précisé à la suite d'un test génétique montrant la mutation du gène NOTCH3, situé sur le chromosome 19 et qui est le critère diagnostic d'une maladie appelée CADASIL (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*). C'est une maladie génétique touchant les capillaires sanguins au niveau du cerveau. En effet, NOTCH3 intervient dans la formation et le fonctionnement des vaisseaux sanguins. Sa mutation entraîne une mauvaise irrigation du sang dans certaines zones et provoque des symptômes très variables pouvant se rapprocher de ceux de la SEP. Nous avons tout de même conservé ce patient afin d'étudier ses clones prédominants dans

le cadre d'une maladie différente de la SEP, afin de voir si nous pouvons trouver une cible antigénique similaire ou non.

Toutes les données cliniques relatives à chaque individu sont détaillées dans le tableau 1.

Patients	ddp	âge	sexe	date du diagnostic	maladie	forme
MeM	13/03/2010	18	M	mars 2016	SEP	RR
GaEr	10/02/2011	33	M	décembre 2010	SEP	RR
BrVi	08/06/2011	21	F	mars 2011	SEP	RR
BoAu	25/02/2013	35	F	avril 2013	SEP	RR
SoMa	26/06/2013	17	F	mai 2013	SEP	RR
VaSa	31/10/2013	34	F	février 2014	SEP	RR
ViAl	10/03/2014	15	F	avril 2014	SEP	RR
KeBe	30/06/2014	43	M	mai 2016	CADASIL	-
		26,6 ± 10.9				

Tableau 1 : Données cliniques des patients. ddp : date du prélèvement ; RR : récurrente-rémittente, âge : en années.

2. Le répertoire : Choix des familles d'intérêt

La première étape de ce projet est de regarder le repertoire dans le LCR et le sang des patients afin d'étudier la présence d'altérations communes au sein des familles Vβ.

Pour effectuer cela, 20 millions de PBMC sont décongelés et marqués à l'aide d'anticorps anti-CD3-PeCy7, -CD4-PE et -CD8-FITC (BD Biosciences) et du DAPI pour la viabilité. Ces cellules sont triées à l'aide du cytomètre en flux trieur FACS ARIA II (BD Biosciences) pour isoler les populations CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD8⁺. Une extraction d'ARN est réalisée sur les deux sous-populations par Trizol (Invitrogen). Sur les cellules du LCR, l'extraction d'ARN est réalisée selon le Kit Rneasy micro (Qiagen). Ce kit permet l'extraction de petites quantités d'ARN. Le spectrophotomètre Nanodrop 2100 (Nanodrop technologies) et le bionalyseur Agilent 2100 (Agilent technologies) permettent respectivement d'évaluer la concentration et l'intégrité de l'ARN.

Le répertoire est réalisé sur 200ng, 400ng ou 1000 ng (quantités différentes en fonction des prélèvements) pour les CD4⁺ et les CD8⁺ du sang et sur la totalité de l'échantillon d'ARN pour

le LCR soit entre 6.24 ng et 79.2 ng en fonction des échantillons. L'ARN étant plus sensible de part sa forme simple brin, il est plus facile d'étudier l'ADN complémentaire (ADNc) c'est pour cette raison qu'une RT (*Reverse Transcriptase*) est effectuée. Afin de retrotranscrire les ARN messagers (ARNm), nous utilisons une amorce poly-dT qui s'hybride à la queue poly A de l'extrémité 3' des ARNm et permet à l'enzyme M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) de retrotranscrire à partir de cette extrémité en présence d'oligonucléotides A, T, C, G à la température de 42°C pendant 1h.

Afin d'étudier le répertoire, des amplifications en chaînes par polymérase ou *Polymerase chain reaction* (PCR) sont réalisées. Cette technique permet l'amplification de séquences d'ADNc à l'aide d'un couple d'amorces qui vont s'hybrider sur des régions spécifiques, ici les séquences correspondant aux chaînes β ou α du TCR afin d'étudier plus spécifiquement la région CDR3 de ces chaînes.

L'annexe 2A illustre la méthodologie employée pour identifier la chaîne β . La région CDR3 est amplifiée au cours de 2 PCR successives (PCR I et II) de 40 cycles chacune, dans un thermocycleur 9700 (Applied biosystems, Foster City, CA) (Skulina et al., 2004). Pour la PCR I on utilise la taq-polymerase GOLD (Applied biosystems) suivant les recommandations du fabricant. Vingt-cinq réactions différentes sont réalisées, chacune utilisant une des 24 amorces (Annexe 3) sens $V\beta$, conçues selon la classification d'Arden (Arden et al., 1995) et permettant d'amplifier les différentes familles $V\beta$, avec une amorce antisens « Spty-b-out » spécifique des 2 régions constantes $C\beta$ (Junker et al., 2007). La 25^{ème} réaction est effectuée avec une amorce sens et antisens pour l'HPRT qui est un contrôle interne de présence d'ADNc. La PCR II, dite semi-nichée est réalisée avec une taq-polymérase (Invitrogen). Elle utilise les mêmes amorces $V\beta$ mais une amorce antisens différente « $C\beta_r$ » s'hybridant en amont de la « Spty-b-out » (Monteiro et al., 1996). Ensuite une étape de run-off est effectuée avec une amorce $C\beta$ -FAM (fluorochrome). Cette étape permet de marquer les amplicons afin de déterminer leurs longueurs à l'aide d'un séquenceur à capillaire (AB3037, Applied biosystems) (Plateforme génomique de Nantes). Il est possible ensuite d'analyser à l'aide du logiciel GeneMapper (Applied biosystems) la répartition des longueurs de CDR3 pour chaque famille $V\beta$ ainsi qu'avec un package développé sous le logiciel R dans le cadre de la plateforme d'analyse du répertoire TCR $V\beta$ de l'IHU CESTI.

Les profils peuvent être classés en cinq types de gaussien à monoclonal (Figure 8A). A partir de ces résultats, il est possible de faire une comparaison des profils obtenus dans les LT CD8⁺ du sang et le LCR pour chaque famille (Figure 8B). Pour les profils les plus oligoclonaux, un séquençage direct des produits de PCR sur les différentes familles d'intérêts est réalisé afin de s'assurer que les pics de même longueur observés dans les différents compartiments, au sein d'une même famille V β correspondent à des clones β identiques (Figure 8C). Cette analyse de séquence est effectuée avec le logiciel Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd).

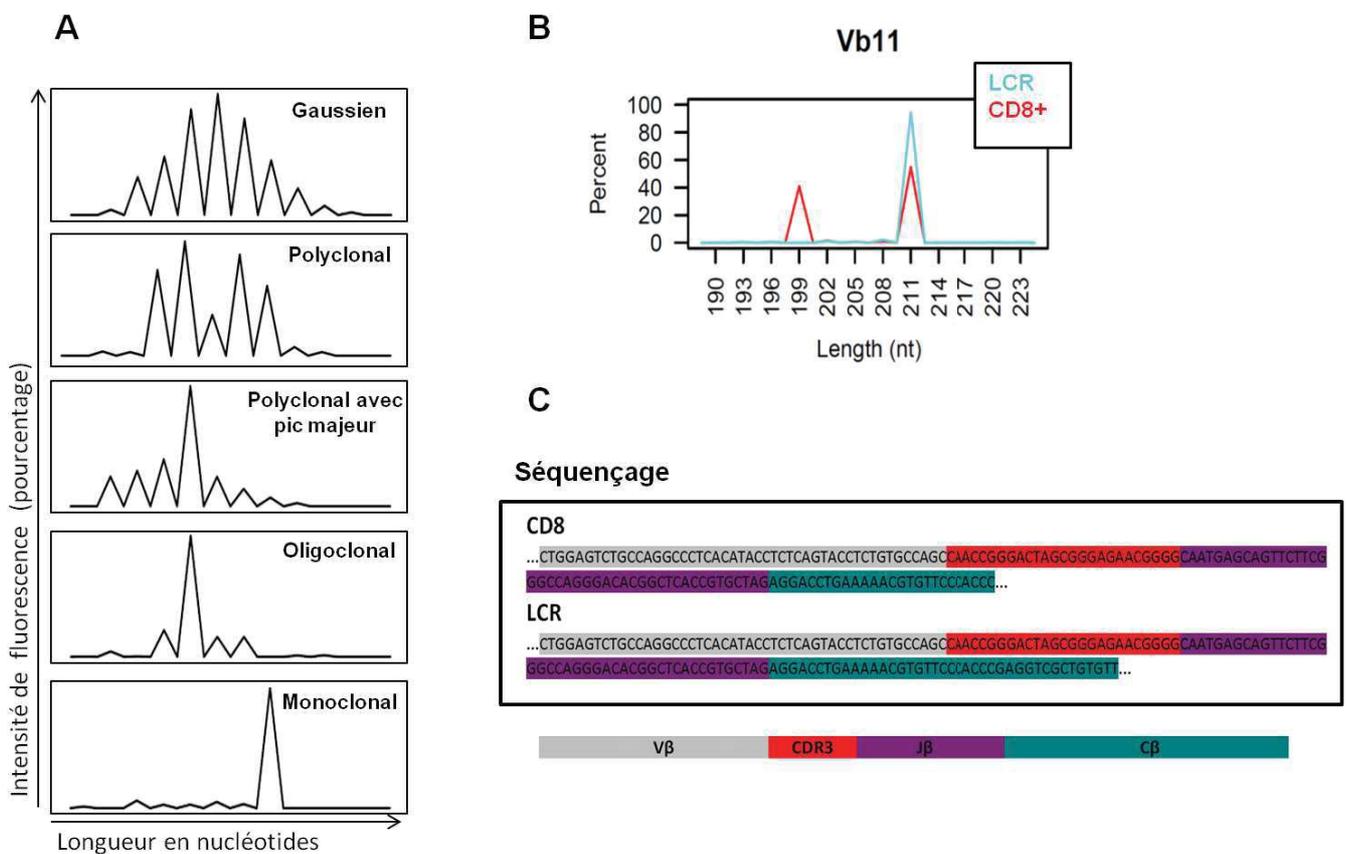


Figure 8 : Représentation et comparaison des différentes distributions de longueurs de CDR3 dans le LCR et les LT CD8⁺. **A.** Les différentes distributions sont déterminées ainsi : Monoclonal (pic majeur > 80% et tous les autres < 10%), oligoclonal (≤ 4 pics, chacun > 5%), polyclonal avec pic majeur (> 4 pics, pic majeur > 40% et deux fois plus que le deuxième pic majeur), polyclonal ou gaussien (autres distributions, polyclonal quand pics déplacés par rapport à une distribution gaussienne). **B.** Exemple d'une comparaison LCR (monoclonal) et CD8⁺ (oligoclonal) pour la famille V β 11 du patient SoMa. **C.** Exemple d'une comparaison de séquençage pour la même famille.

Nous avons comparé les 24 familles pour les 8 patients inclus dans l'étude et nous avons conservé pour la suite de l'étude seulement les familles oligoclonales pour laquelle nous avons des séquences β identique pour le LCR et les LT CD8⁺ et pour lesquelles un anticorps anti-chaîne V β était commercialisé. En effet, pour la suite de l'étude nous aurons besoin de sélectionner les LT CD8⁺ par famille V β et par cytométrie en flux.

3. Identification du TCR

Après comparaison et validation des séquences du LCR et des LT CD8⁺, nous avons obtenu l'identification de la chaîne β du TCR. La deuxième étape de ce projet est d'obtenir la chaîne α correspondante, deux méthodes ont été testées (figure 9).

La première méthode utilisée sur les premiers patients (GaEr, MeM, BrVi, BoAu, VaSa et SoMa) a été l'amplification des cellules du LCR par culture. Suite à cette amplification, les cellules portant les chaînes β d'intérêt sont triées en cellule unique afin d'identifier la chaîne α correspondante directement par PCR. La méthode de culture employée permet, en théorie, d'amplifier tous les LT de manière non biaisées c'est-à-dire sans sélection de clones particuliers. Pour cela on incube les cellules du LCR pendant 3 à 5 semaines avec de l'IL-2 à 250UI/mL (qui stimule la prolifération lymphocytaire) + de la phytohémagglutinine (PHA) à 1 μ g/mL (utilisée comme mitogène pour déclencher la division cellulaire des LT) et on ajoute 5.10⁶ PBMC préalablement irradiés provenant d'au moins 2 témoins sains ainsi que 1.10⁶ B-EBV irradiés. Ce mélange de cellules allogéniques permet une diversité qui ne biaise pas l'amplification des cellules du LCR. Tous ces composants permettent une activation et donc une multiplication des LT.

Cette méthode, bien qu'ayant engendré une amplification dans le cas du patient MeM, n'a pas fonctionné pour les autres. Il s'avère que le répertoire avant et après la culture n'est pas similaire. Ceci suggère une amplification de clones à faible fréquence et la disparition des clones prédominants. Il semblerait donc que lors de la mise en culture les clones d'intérêts ne sont plus ou pas tout le temps retrouvés (figure 9).

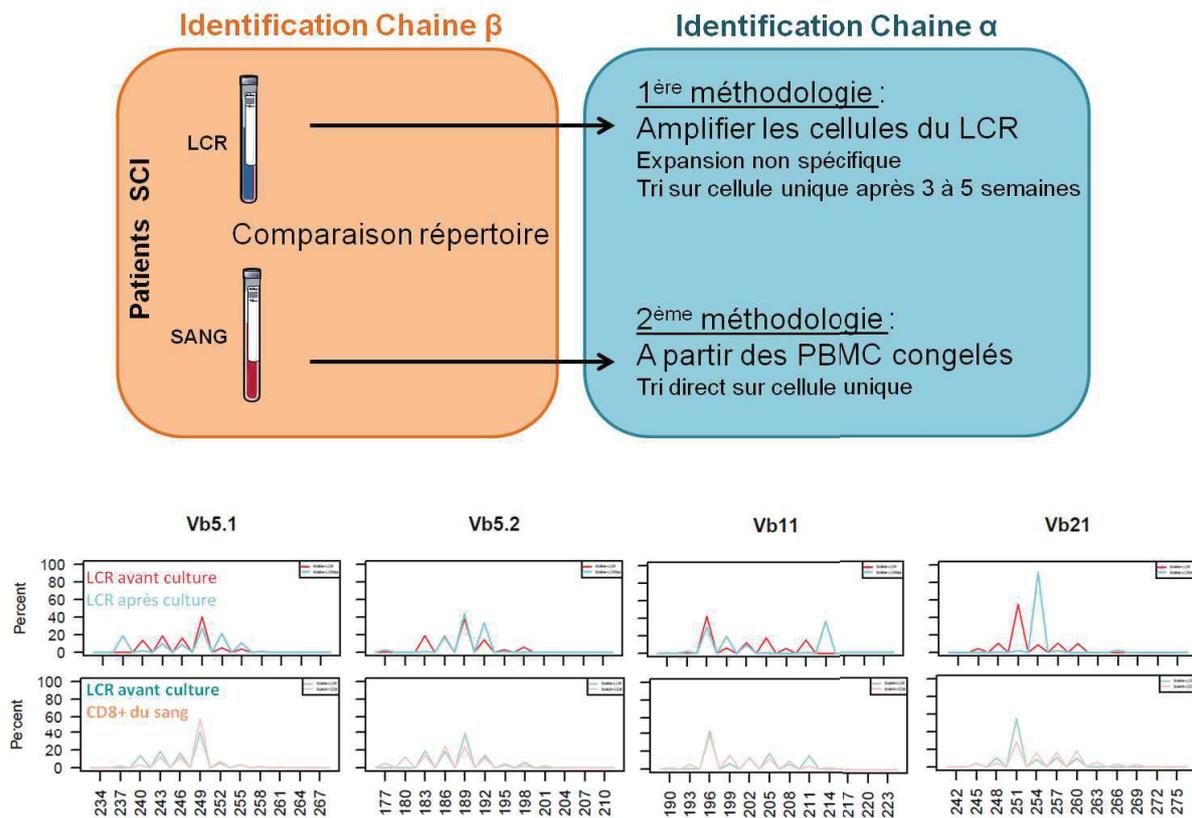


Figure 9 : Comparaison du répertoire des cellules T du LCR amplifiées ou non et des LT CD8⁺ du sang. Exemple pour le patient SoMa et les familles Vβ 5.1, Vβ 5.2, Vβ 11, Vβ 21. Culture sur 5 semaines : IL-2 à 250UI/mL + PHA à 1μg/mL + 5.10⁶ PBMC de 3 donneurs différents irradiés +1.10⁶ B-EBV irradiés. Pour certaines familles la comparaison du LCR avant et après culture est plus différente que la comparaison du LCR et des LT CD8⁺ du sang. Même lorsque la répartition est identique on ne trouve pas forcément la même séquence que le clone prédominant retrouvé dans le répertoire avant culture (résultats non montrés).

Afin de remédier à ce problème, nous avons par la suite appliqué une deuxième méthode (pour le patients SoMa et KeBe) qui consiste à utiliser directement les PBMC du sang. Comme montré précédemment, nous comparons le répertoire dans ces 2 compartiments et nous choisissons les clones surreprésentés de façon identique au sein de leur famille Vβ dans le LCR et les LT CD8⁺ du sang. L'identification de la chaîne α peut donc être réalisée à partir des LT CD8⁺ du sang. Il est bien entendu primordial de contrôler que la séquence de la chaîne β correspond totalement à la séquence de la chaîne β retrouvée dans les cellules du LCR.

Dans les deux méthodes la technique est identique. Afin d'obtenir le TCR complet, nous passons à l'étape de tri unicellulaire afin de sélectionner spécifiquement les cellules correspondant à la famille Vβ étudiée que nous voulons caractériser. Les cellules du LCR

préalablement amplifiées ou celles du sang sont marquées avec des anticorps anti-CD3-APC (BD Biosciences), -CD8-PeCy7 (BD Biosciences) et -V β x - PE ou FITC (Beckman Coulter) et du DAPI pour la viabilité. Ces cellules sont alors triées à l'aide du cytomètre en flux trieur FACS ARIA II par une méthode permettant d'isoler une cellule par puits en plaque 96 puits, selon les recommandations du constructeur.

L'annexe 2B illustre la méthodologie employée pour identifier la chaîne α . Afin d'étudier le TCR de chaque cellule unique, nous utilisons un kit qui retro-transcrit et amplifie l'ARNm spécifiquement sur peu de matériel (Kit One-step RT-PCR, Qiagen). Cette première RT-PCR est effectuée avec 2 couples d'amorces α et β . Un premier couple avec l'amorce sens V β x (spécifique de la famille étudiée) et antisens C β . Un second pool de 24 amorces V α sens et une amorce antisens C α (C α -rev-out) (Annexe 3). Cette première PCR nous permet de préamplifier les chaînes α et β portées par notre cellule isolée.

Après cette première PCR nous effectuons 2 PCR semi-nichées en utilisant des amorces spécifiques de notre clone d'intérêt afin d'amplifier la chaîne β portée par la cellule isolée. Ces PCR semi-nichées nous permettent de vérifier ensuite par séquençage que la cellule isolée porte la bonne chaîne β qui correspond à la chaîne β identifiée et partagée par le LCR et les LT CD8⁺ du sang.

Sur les cellules portant la bonne chaîne V β , nous effectuons à partir de la PCR1, une dernière PCR (PCR4) avec 5 pools d'amorces V α en sens et une amorce C α (C α -rev-in) en antisens. Les amorces utilisées dans ces 5 pools recouvrent une grande partie des chaînes V α existantes chez l'homme. Le séquençage direct du produit de PCR nous permet d'identifier la chaîne α correspondant à la chaîne β que nous avons sélectionnée au départ.

En parallèle de l'identification des clones provenant des patients, nous avons caractérisé la chaîne α du TCR d'un clone LT CD8⁺ reconnaissant le peptide immunodominant de Melan-A (ELAGIGILTV), dans un contexte HLA-A*0201. Cette caractérisation a pu se faire par l'utilisation d'ARN gracieusement mis à notre disposition par Nathalie Labarrière (U892, Nantes). Ce clone va nous servir par la suite de contrôle positif de notre méthode puisque nous connaissons sa cible antigénique.

4. Création des plasmides

La troisième étape de notre projet est de pouvoir étudier *in vitro* la reconnaissance antigénique de ces clones. Pour cela, il nous faut créer une lignée cellulaire exprimant un TCR fonctionnel. La séquence complète du TCR est composée d'une chaîne α (VJC) et d'une chaîne β (VDJC) d'environ 900 pb chacune. Il faut en plus y ajouter la séquence signal (environ 60 pb) qui permet l'adressage à la membrane et qui a été vérifiée en fonction des différentes combinaisons des clones (Annexe 4).

Nous utilisons un vecteur d'expression pRc/RSV (life technologies) afin de pouvoir y intégrer la séquence de ces chaînes. La plupart des vecteurs d'expression possèdent un promoteur eucaryote qui leur permet de produire un seul gène donné. On peut y ajouter des promoteurs particuliers ORF (*open reading frame*) ou IRES (*Internal ribosome entry site*) qui permettent de traduire plusieurs gènes avec plus ou moins de facilité. Le premier inconvénient de ces promoteurs est leur taille au sein du plasmide qui limite la capacité de clonage. Le second inconvénient notamment pour l'IRES est que la traduction du deuxième gène est toujours moins efficace que le premier. Cela peut poser un problème pour notre méthode puisque nous avons besoin de la même efficacité de transcription de chaîne α et β pour avoir une molécule complète de TCR.

C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser des peptides 2A. Ce sont des petits peptides de 19-22 acides aminés (Tableau 2), auto-clivables, découverts chez le virus de la fièvre aphteuse ou FMDV virus (*Foot-and-mouth disease virus*) (peptide F2A) qui fait partie de la famille des picornavirus. Ce clivage est un phénomène universel qui fonctionne chez toutes les cellules eucaryotes mais n'a pas été observé chez les procaryotes. La dénomination 2A fait référence la région spécifique de polyprotéines des picornavirus où se trouve cette séquence (Ryan MD et al, 1991). Ces peptides prennent donc très peu de place au sein d'un plasmide et ils permettent également d'obtenir une production stœchiométrique des gènes placés en amont et en aval de cette séquence. Par la suite différents peptides 2A dérivés d'autres virus ont été découverts, notamment dans l'Equine Rhinitis A Virus (peptide E2A), le Porcine Teschovirus-1 (peptide P2A) et le Thosaasigna Virus (peptide T2A). Plusieurs études ont cherché à déterminer lequel des peptides 2A avait la meilleure efficacité de clivage. Il semblerait que selon le type de cellules et/ou d'espèces et le type de plasmides utilisés cette

efficacité est variable. Une étude a démontré que l'efficacité de clivage du P2A était la meilleure (suivi du T2A, E2A et F2A) sur différentes lignées cellulaires humaines, sur des embryons de Zebrafish ainsi que dans un modèle de souris (Kim et al., 2011).

P2A	G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N* P G P GGC TCC GGA GCC ACG AAC TTC TCT CTG TTA AAG CAA GCA GGT GAC GTG GAG GAG AAT CCC GGC CCT
T2A	G S G E G R G S L L T C G D V E E N* P G P GGC TCC GGA GAG GGC AGA GGA AGT CTT CTA ACA TGC GGT GAC GTG GAG GAG AAT CCC GGC CCT
E2A	G S G Q C T N Y A L L K L A G D V E S N* P G P GGC TCC GGA CAG TGT ACT AAT TAT GCT CTC TTG AAA TTG GCT GGA GAT GTT GAG AGC AAT CCC GGC CCT
F2A	G S G V K Q T L N F D L L K L A G V E S N* P G P GGC TCC GGA GTG AAA CAG ACT TTG AAT TTT GAC CTT CTC AAG TTG GCG GGA GTG GAG TCC AAT CCC GGC CCT

Tableau 2 : Séquences des peptides 2A. Séquences en acides aminés représentés par une lettre et en acides nucléiques en codon. Le site de clivage est représenté par un astérisque. La séquence en amont de ce site de clivage reste sur la partie C' terminal de la chaîne α et la séquence d'acides aminés en aval reste sur la partie N' terminale de la chaîne β .

Nous avons donc fait synthétiser la séquence entière de chaque TCR (Life technologies) en intégrant entre les 2 chaînes un peptide 2A dans un vecteur d'expression pRc/RSV(Life technologies) de 5224 pb possédant un gène de résistance à la néomycine (Annexe 5). Dans notre modèle nous avons testé le T2A puis le P2A et l'E2A. L'échange de séquence du peptide 2A a été réalisé par mutagenèse dirigée ou une synthèse complète a été effectuée pour échanger la séquence du peptide 2A par une autre (life technologie). Afin d'amplifier les plasmides, ceux-ci sont électroporés dans des bactéries *Escherichia Coli* qui sont mises en culture à 37°C pendant 16h pour amplifier les plasmides. Le laboratoire de Biologie moléculaire de notre unité a effectué une « Mini-prep » (Nucleospin Plasmid, Macherey nagel) selon les conditions du fabricant permet ensuite d'extraire et de purifier les plasmides. Une digestion enzymatique est finalement réalisée pour vérifier l'intégrité de chaque plasmide.

5. Mise en place de lignées stables d'hybridomes

Il a pu être caractérisé 8 TCR correspondants à des clones de 3 patients différents (2 patients SEP : MeM avec les clones 1, 2, 3, 4 et SoMa avec les clones 5 et 6 ; et 1 patient CADASIL : KeBe avec les clones 7 et 8). Ainsi que le clone clone 9-Melan A correspondant à un clone positif pour lequel nous connaissons la cible antigénique. (détails des séquences dans la partie résultats)

Afin de permettre une transfection stable pour obtenir des lignées exprimant le TCR nous avons utilisé un modèle intégratif de plasmide en effectuant une électroporation. Cette technique permet l'introduction d'un plasmide dans les cellules grâce à l'augmentation de la perméabilité membranaire par un courant électrique. Nous avons utilisé un hybridome de LT de souris immortalisé n'exprimant ni de chaîne α ni de chaîne β endogène du TCR, nommée 58 $^{\alpha\beta-}$ (Letourneur et Malissen 1989) (gracieusement mise à disposition par le Professeur Klaus Dornmair, Munich).

Cinq millions de cellules 58 $^{\alpha\beta-}$ sont lavées 2 fois avec du milieu RPMI 1640 froid (Life technologie) et sans sérum puis placées dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie à laquelle on ajoute 30 μ g de plasmides. L'électroporation (Gene pulser II Electroporation system, Biorad) est réalisée à 960 μ F, 280V avec un temps d'environ 15 à 18 mS. Les cuves sont placées 5 min sur glace. Les cellules sont ensuite transférées dans 15 mL de milieu RPMI 1640 (Gibco) + 10% SVF (Lonza) + Penicilline/Streptomycine (Invitrogen) + Glutamine (Sigma-Aldrich) (Milieu complet) préchauffé à 37°C et incubées 30 min à température ambiante. Puis les cellules sont placées dans une flasque de culture 75cm² avec un ajout de 15 mL de milieu complet et incubées 48h dans un incubateur à 37°C+5%CO₂.

Après 2 jours, l'antibiotique de sélection, la généticine (G418) (Millipore) est ajoutée à la concentration de 1 mg/mL pendant 10-15 jours afin de sélectionner les cellules transfectées. L'expression du TCR est vérifiée par un marquage par cytométrie en flux (LSR II, BD Biosciences). Cette technique permet d'étudier des caractéristiques morphologiques (tailles et structures) mais aussi phénotypiques à l'aide d'anticorps fluorescents qui vont marquer les cellules. Celles-ci vont passer devant des lasers et la fluorescence va être captée par des détecteurs. Les données recueillies permettent d'étudier différentes populations cellulaires.

Les cellules sont marquées pendant 30 min à 4°C avec un anticorps anti-CD3e-FITC souris (BD Biosciences, 145-2C11) et un anticorps anti-V β -PE humain (V β 5.1 pour le clone 5 ; V β 5.3 pour le clone 9 ; V β 11 pour les clones 6 et 7 ; V β 13.2 pour les clones 1,2,3,4 et 8)(Beckman coulter).

Afin de recréer un clone complet de LT CD8⁺, nous avons fait exprimer à nos lignées le CD8 humain. Pour cela nous utilisons une lignée cellulaire appelée GP-E86 stablement transfectée avec le plasmide pLPCX-CD8a-IRES2_b (gracieusement mise à disposition par le Professeur Klaus Dornmair). Cette lignée est un fibroblaste de souris qui permet de produire des vecteurs rétroviraux pour livrer des gènes dans les cellules eucaryotes et donc de rendre la transfection stable. Il est couplé à un gène de résistance à la puromycine. Pour cela, nos hybridomes sont cultivés sur des GP-E86-CD8a confluentes pendant 2 jours, lavés puis sélectionnés pendant 2 jours par addition de G418 (1mg/mL) + puromycine (2 μ g/mL). L'expression de CD8 est vérifiée par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps anti-CD8-APC (BD Biosciences, RPA-T8). Une lignée a été transfectée seulement avec le CD8 afin d'obtenir une lignée « contrôle négatif » ne possédant pas de TCR, appelée clone 58-CD8.

6. Validations des lignées

6.1 Sélection et purification des lignées

Une étape de vérification des marqueurs et de sélection des lignées est effectuée pour obtenir des lignées exprimant le plus fortement le CD3e, le V β et le CD8. Les cellules sont marquées pendant 30 min à 4°C avec un anticorps anti-CD3e-FITC souris (BD Biosciences, 145-2C11), avec un anticorps anti-CD8-APC et un anticorps anti-V β -PE humain (V β 5.1 pour le clone 5 ; V β 5.3 pour le clone 9 ; V β 11 pour les clones 6 et 7 ; V β 13.2 pour les clones 1,2,3,4 et 8)(Beckman coulter). Ces cellules sont ensuite triées à l'aide du cytomètre en flux trieur ARIA II afin de sélectionner les populations CD3e⁺V β X⁺CD8⁺. Elles sont ensuite remises en culture et un marquage est de nouveau réalisé 3 jours après pour vérifier l'expression du CD3, du V β et du CD8.

Afin de conserver ces lignées, nous les avons congelées en SVF + 10% DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma-Aldrich) puis stockées dans l'azote liquide. Toutes les lignées ont été congelées entre le passage 14 à 16 après transfection.

6.2 Vérification de la sécrétion d'IL-2 par ELISA

L'hybridome 58^{α-/β-}, si il possède un TCR fonctionnel et que celui-ci est activé, va sécréter de l'IL-2 de souris. Nous allons dans la suite du projet utiliser cette donnée afin de vérifier la fonctionnalité des clones.

Nous avons stimulé nos lignées établies, ainsi que la lignée non transfectée (58^{α-/β-}) et la lignée transfectée seulement avec le CD8 (58-CD8) en présence de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + ionomycine ou d'anticorps anti-CD3e de souris. La PMA active la protéine kinase C avec l'aide de la ionomycine qui augmente le flux calcique. La protéine kinase C va permettre de lancer une cascade de signal de transduction qui va activer la cellule. Cette activation n'est pas dépendante du TCR. L'anticorps anti-CD3e va s'accrocher sur le CD3 et activer la cellule artificiellement via le complexe moléculaire CD3-TCR. Cette activation est donc dépendante du TCR. Les différentes lignées (40 000 cellules/puits 96 puits fond rond) ont été incubées pendant 16h avec 20ng/mL de PMA (Sigma-Aldrich) et 500ng/mL de Ionomycine (Sigma-Aldrich) dans 200 µL de milieu complet ou sur des puits préalablement recouverts pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, 145-2C11) ou incubées seulement avec du milieu complet. Un dosage de l'IL-2 de souris est réalisé sur les surnageants (dilués au 1/100) avec le kit ELISA (EZMIL2, Mouse IL-2 ELISA Kit Merck millipore). L'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est une méthode immuno-enzymatique qui permet de doser dans le surnageant de culture par exemple des protéines tels que les cytokines.

6.3 Vérification du clone 9 Melan-A par utilisation d'un tétramère

Pour rappel, le clone 9 est notre contrôle positif, celui ci reconnaît le peptide immunodominant pour Melan-A (25-36) restreint aux HLA-A2 et nous avons utilisé des tétramères pour contrôler leur reconnaissance antigénique. Les tétramères CMH sont des

complexes de 4 molécules de CMH (ici CMH-I) qui sont associés avec un peptide spécifique et liés à un fluorochrome. Ils sont souvent utilisés pour détecter et quantifier directement les lymphocytes T antigène-spécifique et donc de mesurer la réponse cellulaire dirigée contre un peptide donné.

Nous avons marqués les clones 58-CD8 (sans TCR) , clones 3 et 5 (non spécifique du Melan-A) et le clone 9 avec le tétramère HLA2nT-Melan-A-APC à la concentration de 5 µg/mL pendant 1h. Nous avons visualisé en cytométrie en flux la reconnaissance des clones pour le tétramère pour la condition 1h afin de visualiser la reconnaissance du tétramère. Nous avons ensuite marqués les même clones avec le tétramère HLA2nT-Melan-A-APC à différentes concentrations 5, 10, 20 µg/mL pendant 1h ou 16h afin de recueillir les surnageants de culture. Le contrôle d'activation a été effectué avec des puits préalablement recouvert pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, clone : 145-2C11) puis incubé avec les clones pendant 16h. Les surnageants ont été récoltés et un dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA à été effectué.

7. Test de reconnaissance antigénique

La dernière étape de ce projet, après vérification de la fonctionnalité de nos clones, est de pouvoir identifier leur spécificité antigénique. Pour cela différents tests ont été mis en place et sont détaillés dans les paragraphes suivants.

Avant chaque test les lignées sont décongelées la semaine précédente. Une décongélation rapide de chaque ampoule est effectuée à 37°C puis le contenu est transféré dans du milieu RPMI complet préalablement chauffé à 37°C. Les lignées sont ensuite placées dans des flasques 75cm² dans un volume de 20 mL de milieu complet avec ajout des antibiotiques de sélection correspondants G418 (1mg/mL) + puromycine (2µg/mL). Avant chaque test de reconnaissance antigénique, un marquage en cytométrie en flux est effectué sur les hybridomes afin de vérifier la présence à leur surface du CD3 de souris, du CD8 humain et du TCR.

Dans ce système il faut pouvoir présenter directement des peptides aux clones via des cellules présentatrices d'antigène exprimant les molécules de CMH-I autologue de chaque patient. Nous avons fait réaliser un typage HLA par l'EFS de Nantes des 3 patients (Tableau 3).

	HLA typing (Class I)	HLA typing (Class II)
MeM	A*0101 A*2402 B*0702 B*0801	DRB1*0101 DRB1*1501 DQB1*0501 DQB1*0602
SoMa	A02 A03 B07 B15	DRB1*03 DRB1*15 DQB1*02 DQB1*06
KeBe	A29 A32 B18 B38	DRB1*13 (homozygote?) DQB1*06 (homozygote?)
Melan- A	A0201	

Tableau 3 : Typage HLA du CMH-I et du CMH-II des 3 patients.

Béatrice Clémenceau de l'UMR_S1232 de Nantes a créé pour les 3 patients (MeM, SoMa et Kebe) des lignées B-EBV ou BLCL (*B Lymphoblastoid Cell Line*) dérivées de LB immortalisés à l'aide du virus EBV. Ces lignées ont été réalisées à partir des PBMC des patients et vont nous servir de cellules présentatrices autologues des peptides que nous voulons tester. En contrôle de notre technique nous avons utilisé le clone 9 qui, pour rappel, possède un TCR qui reconnaît, dans un contexte HLA-A*0201, le peptide immunodominant de Melan-A 25-36 (ELAGIGILTV). Nous avons donc utilisé la lignée B-EBV du patient SoMa qui possède également le HLA-A*02.

7.1 Peptides de la myéline

Une co-culture des clones avec les lignées autologues B-EBV a été effectuée à un ratio de 1:2 (40 000 clones pour 80 000 BLCL) avec addition des peptides à 10 µg/mL pour le pool MOG, MBP, PLP, CEF et les peptivator MOG, MBP, PLP à 6 nmol/peptide (Miltenyi Biotec) ou du peptide Melan-A (25-36) (Anaspec) à 10 µg/mL pendant 16h dans des plaques 96 puits à fond rond. Le contrôle d'activation a été réalisé avec des puits préalablement recouverts pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, clone : 145-2C11) puis

incubé avec les clones pendant 16h. Les surnageants de cultures ont été récoltés et un dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA a été effectué.

7.2 Peptides dérivés de protéines apoptotiques

Une co-culture des clones avec les B-EBV correspondants a été effectuée à un ratio de 1:2 (40 000 clones pour 80 000 B-EBV) avec addition des pool 1 à 19 à 10 µg/mL ou du peptide Melan-A (25-36) à 10 µg/mL (Anaspec) à 10 µg/mL pendant 16h dans des plaques 96 puits à fond rond. Le contrôle d'activation a été réalisé avec des puits préalablement recouverts pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, clone : 145-2C11) puis incubé avec les clones pendant 16h. Les surnageants de cultures ont été récoltés et un dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA a été effectué.

7.3 Protéines issues de lysats cellulaires du SNC

Afin de tester la reconnaissance des clones pour des protéines, il nous faut obtenir des cellules présentatrices d'antigène (CPA) capables de phagocyter ces protéines pour ensuite les présenter à leur surface par leur CMH-I. Pour ce faire nous avons prélevé à nouveau les patients, pour lesquels nous avons caractérisé les clones (KeBe et SoMa encore suivis au CHU de Nantes), afin de différencier les monocytes du sang en cellules dendritiques (DC) autologues. Avec le service Bioréactifs de l'EFS de Nantes, nous avons pu obtenir un prélèvement d'un témoin sain, dont le typage HLA est identique à celui de notre patient MeM (non suivi au CHU de Nantes) afin d'obtenir des DC allogéniques.

Dans tous les cas, le protocole suivant est appliqué pour la différenciation de monocytes en DC. Les monocytes sont triés par tri à l'Automacs (Miltenyi Biotec) à l'aide de billes magnétiques grâce au « monocytes isolation kit II » (Miltenyi Biotec). Ce kit va marquer toutes les cellules à l'aide d'anticorps sauf les cellules CD14⁺, la fraction négative de ce tri va donc être constituée principalement de monocytes. Les cellules sont mises en culture en plaque 6 puits avec du GM-CSF à 1000 UI/mL (CellGenix GmbH) et de l'IL-4 à 200 UI/mL (CellGenix GmbH) pendant 6 jours, entraînant leur différenciation en DC. Ceux-ci sont ensuite maturés en ajoutant 1 µg/mL de lipopolysaccharide (LPS) pendant 48h à 37°C. A 6

jours et 8 jours, un marquage par cytométrie en flux est réalisé pour s'assurer de la différenciation et de la maturation grâce aux marqueurs suivants : anti-CD209-PE (BD Biosciences ,DCN46), -CD83-PE (BD Biosciences ,HB15e), -CD80-FITC (BD Biosciences ,BB1), -HLA-DR-APC(BD Biosciences ,G46-6), -CD86-APC(BD Biosciences ,2331 FUN-1), -CD40-FITC (BD Biosciences ,5C3). Après confirmation, les cellules sont congelées dans du SVF + 10% DMSO et conservées dans l'azote liquide.

Une co-culture des clones avec les DC autologues a été effectuée à un ratio de 1:5 (20 000 clones pour 100 000 DC) avec addition des lysats cellulaires à 20 µg/mL ou du peptide Melan-A (25-36) (Anaspec) à 10 µg/mL dans une plaque 96 puits à fond rond. L'anticorps bloquant anti-CMH-I (W6/32) est incubé 30 min à la concentration 1/100. Le contrôle d'activation est réalisé avec des puits préalablement recouvert pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, clone : 145-2C11) puis incubé avec les clones pendant 16h. Les surnageants de culture sont récoltés et un dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA est effectué.

RESULTATS

VII. Résultats

1. Caractérisation des LT CD8⁺ d'intérêt dans le LCR de patients

Pour rappel, nous étudions le répertoire, des patients présentant un SCI, dans le LCR et le sang afin d'observer la présence commune de clones CD8⁺ prédominants au sein d'une famille V β et d'identifier la séquence de leur chaîne β . Cette étape nous permet de sélectionner les familles V β intéressantes pour la suite de l'étude.

Dans le tableau suivant nous avons comparé les différentes séquences de la chaîne β V β -CDR3-J β -C β (VDJC) retrouvées lors de la PCR sur cellule unique en les classant en fonction des différents J β identifiés.

Clones SoMa						Clones KeBe					
Clone 5: TRBV5-1 (Vb5.1)			Clone 6: TRBV25-1 (Vb11)			TRBV5-1 (Vb5.1)			Clone 7: TRBV25-1 (Vb11)		
J β	Nb séquences	similarité	J β	Nb séquences	similarité	J β	Nb séquences	similarité	J β	Nb séquences	similarité
TRBJ2-7*01	5	8,9%	TRBJ2-7*01	9	10,5%	TRBJ2-7*01	16	23,2%	TRBJ2-7*01	1	1,8%
TRBJ2-5*01	3	5,4%	TRBJ2-6*01	1	1,2%	TRBJ2-5*01	3	4,3%	TRBJ2-5*01	1	1,8%
TRBJ2-3*01	4	7,1%	TRBJ2-5*01	13	15,1%	TRBJ2-3*01	12	17,4%	TRBJ2-2*01	1	1,8%
TRBJ2-2*01	4	7,1%	TRBJ2-4*01	1	1,2%	TRBJ2-2*01	4	5,8%	TRBJ2-1*01	49	89,1%
TRBJ2-1*01	8	14,3%	TRBJ2-3*01	8	9,3%	TRBJ2-1*01	13	18,8%	TRBJ1-4*01	1	1,8%
TRBJ1-6*01	22	39,3%	TRBJ2-2*01	6	7,0%	TRBJ1-6*01	1	1,4%	TRBJ1-2*01	1	1,8%
TRBJ1-2*01	4	7,1%	TRBJ2-1*01	18	20,9%	TRBJ1-4*01	1	1,4%	TRBJ1-1*01	1	1,8%
TRBJ1-1*01	6	10,7%	TRBJ1-6*01	1	1,2%	TRBJ1-2*01	3	4,3%	TOTAL	55	100%
TOTAL	56	100%	TRBJ1-5*01	4	4,7%	TRBJ1-1*01	16	23,2%			
			TRBJ1-3*01	1	1,2%	TOTAL	69	100%			
			TRBJ1-2*01	15	17,4%						
			TRBJ1-1*01	9	10,5%						
			TOTAL	86	100%						

Clone 8: TRBV6-3 (Vb13.2)			TRBV13 (Vb23)		
J β	Nb séquences	similarité	J β	Nb séquences	similarité
TRBJ2-7*01	6	13,6%	TRBJ2-7*01	1	3,3%
TRBJ2-5*01	6	13,6%	TRBJ2-3*01	2	6,7%
TRBJ2-3*01	6	13,6%	TRBJ2-2*01	1	3,3%
TRBJ2-2*01	4	9,1%	TRBJ2-1*01	5	16,7%
TRBJ2-1*01	13	29,5%	TRBJ1-5*01	1	3,3%
TRBJ1-5*01	2	4,5%	TRBJ1-4*01	3	10,0%
TRBJ1-2*01	2	4,5%	TRBJ1-3*01	1	3,3%
TRBJ1-1*01	5	11,4%	TRBJ1-2*01	4	13,3%
TOTAL	44	100%	TRBJ1-1*01	2	6,7%
			TRBJ2-7*01	1	3,3%
			TRBJ2-5*01	2	6,7%
			TRBJ2-3*01	1	3,3%
			TRBJ2-2*01	2	6,7%
			TRBJ1-2*01	2	6,7%
			TRBJ1-1*01	2	6,7%
			TOTAL	30	100%

Tableau 4 : Vérification de la présence des clones dans les LT CD8⁺ du sang pour les patients SoMa et KeBe. Séquences classées en fonction du J β . La similarité correspond à la comparaison de la séquence VDJC pour chaque cellule en fonction de la séquence préalablement retrouvée dans le LCR.

On peut voir dans ce tableau que les séquences V β du LCR sont retrouvées en différentes proportions dans le sang et que pour certaines familles V β (KeBe : V β 5.1 et V β 23), elles ne sont pas retrouvées du tout. Le Clone 5 correspond à 39% , Clone 6 à 7%, le Clone 7 à 89.1% et le clone 8 à 15.9% de la totalité des cellules triées pour chaque famille V β (Tableau 4). Bien entendu, ces pourcentages ont une représentativité relative puisque réalisés sur peu de cellules mais ils donnent un aperçu de la probabilité de retrouver un clone prédominant lorsqu'on trie un petit nombre de cellules et qu'on obtient leurs séquences.

Dans la globalité, la variabilité des chaînes β et α identifiées par cellules est cohérent ce que l'on sait sur la diversité de recombinaison du TCR. Nous avons trouvé plusieurs chaînes β différentes qui possèdent toutes une même chaîne α . Nous avons obtenu des TCR possédant une chaîne β donnée et 2 chaînes α différentes, l'une sans erreur dans le cadre de lecture et l'autre avec une erreur du cadre de lecture entraînant un codon stop. Et nous avons également trouvé un TCR possédant une chaîne β identique et 2 chaînes α différentes. Dans tous les cas, aucun CDR3 d'un individu n'est retrouvé chez un autre individu, ce qui confirme bien le caractère privé du répertoire.

Après avoir comparé les répertoires pour les patients et analysé les chaînes β puis α , nous avons identifié 8 clones d'intérêts. Ceux-ci sont surreprésentés au sein de leur famille V β de manière identique dans le sang et le LCR et correspondent à 3 patients différents (2 patients SEP : MeM avec les clones 1, 2, 3, 4 et SoMa avec les clones 5 et 6 ; et 1 patient CADASIL : KeBe avec les clones 7 et 8). Pour les autres patients la caractérisation complète n'a pas fonctionné pour différentes raisons. Pour 2 patients (BoAu, ViAl) il n'a pas été retrouvé d'altération majeure du répertoire dans le sang et le LCR. Pour les 3 autres patients (GaEr, BrVi, VaSa), nous avons caractérisé la chaîne β mais la caractérisation de la chaîne α correspondante a échoué (peu de cellules et/ou séquence illisible). Les séquences sont résumées dans le tableau 5.

Patients	Chaîne β	Chaîne α	lignée hybridome	Classification Arden
GaEr	TRBV14 - S QDFP GTG T - TRBJ1-1	-	-	
MeM	TRBV6-2 - T Y P S S G S I E - TRBJ2-7	TRAV8-2 - C V V N - TRAJ48	Clone 1	V β 13.2 V α 1.5
	TRBV6-3 - Y P D R E G Q - TRBJ1-5	TRAV6 - C A L R G G - TRAJ9	Clone 2	V β 13.2 V α 5.1
	TRBV6-2 - S S P D R G F Q - TRBJ1-5	TRAV8-2 - C V V N - TRAJ48	Clone 3	V β 13.2 V α 1.5
	TRBV6-2 - S R T G T F G S - TRBJ1-6	TRAV8-2 - C V V N - TRAJ48	Clone 4	V β 13.2 V α 1.5
BrVi	TRBV11-3 - S L X Q A - TRBJ2-3	-	-	
	TRBV14 - S V D R P W G T - TRBJ1-1	-	-	
BoAu	Repertoire sans alteration majeure	-	-	
VaSa	TRBV13 - S G G P H S - TRBJ2-7	-	-	
SoMa	TRBV5-1 - S S P G T D Y - TRBJ1-6	TRAV8-4 - S D L Y - TRAJ21	Clone 5	V β 5.1 V α 1.2
	TRBV25-1 - S G A G R T A F - TRBJ2-1	TRAV8-3*01 - V V L M D - TRAJ5*01	Clone 6	V β 11 V α 1.4
VIAI	Repertoire sans alteration majeure	-	-	
KeBe	TRBV5-1*01 - L G Q R R D - TRBJ2-3*01	-	-	
	TRBV25-1*01 - S Q P G L A G E R G N - TRBJ2-1*01	TRAV1-2*01 - V N D Y - TRAJ4*06	Clone 7	V β 11 V α 7.2
	TRBV13*01*02 - S R T L Q G G T - TRBJ1-1*01	-	-	
	TRBV6-3*01 - S T D L A G S D N - TRBJ2-1*01	TRAV12-2 - A S R V Y - TRAJ26*01	Clone 8	V β 13.2 V α 2.1
Contrôle				
MelanA	TRBV5-5*01 - C A S S G E G L D T Q Y F G - TRBJ2-3*01	TRAV12-2 - V K A I Y - TRAJ49*01	Clone 9	V β 5.3 V α 2.1

Tableau 5 : Caractérisation des séquences des chaînes β et α des clones. Séquences des chaînes β et α retrouvées chez 8 patients et le contrôle clone 9-Melan-A (Selon la nomenclature IMGT pour les segments V et J et en acides aminés pour le CDR3 en gras. On peut noter que pour le patient MeM les clones 1, 3 et 4 portent la même chaîne α avec des chaînes β différentes.

2. Validation des lignées

2.1 Expression du TCR à la membrane

L'expression du TCR est associée à celle du CD3 et du CD8. Nous avons donc sélectionné les hybridomes co-exprimant les 3 molécules par tri avec un cytomètre trieur ARIA II. Avant ce tri les cellules $CD3e^+V\beta X^+CD8^+$ représentent 30 à 45% des cellules en moyenne, après tri et culture environ 80% des cellules sont $CD3e^+V\beta X^+CD8^+$ (Figure 10A). Afin d'avoir une lignée contrôle, nous avons co-cultivé les $58^{\alpha-\beta}$ seulement avec les cellules GP-E86-CD8a, afin d'obtenir une lignée n'exprimant que le CD8 (Figure 10B).

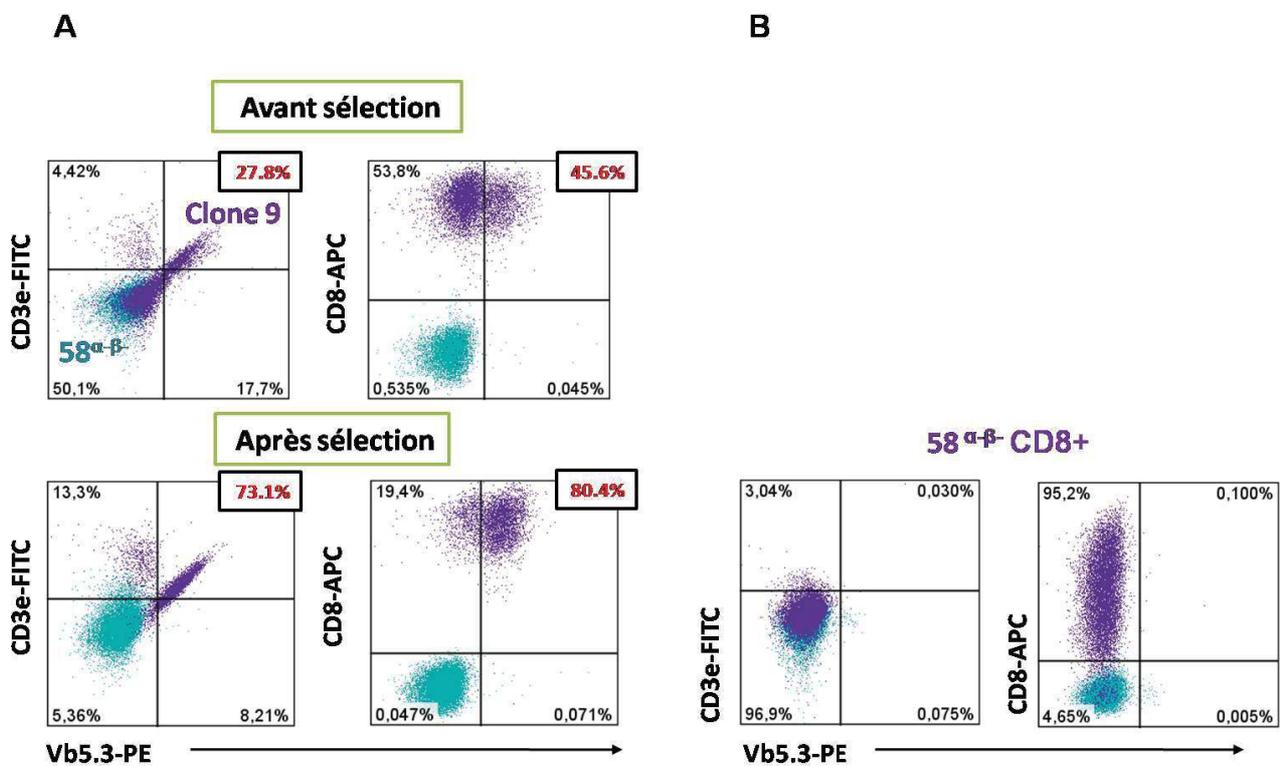


Figure 10 : Efficacité de sélection par cytométrie en flux et vérification du clone contrôle sans TCR. Les cellules non transfectées (en bleu clair) et les cellules transfectées (en violet) A. Marquage du clone 9 CD3e-FITC, CD8-APC et Vb5.3-PE avant sélection par tri avec un cytomètre en flux trieur (BD FACS ARIA II, BD Biosciences) et après sélection et remise en culture 3 jours du clone trié. B. Marquage du clone 58-CD8, CD3-FITC, CD8-APC et Vb5.3-PE.

Après plusieurs séries d'électroporations et de sélections des lignées, nous avons obtenu les clones 2, 3, 4, 5, 7 et 9 (figure 11A). Malgré l'utilisation de plasmides avec différents peptides 2A, nous n'avons jamais réussi à obtenir une expression du TCR à la surface des cellules pour les clones 1, 6 et 8 (figure 11B).

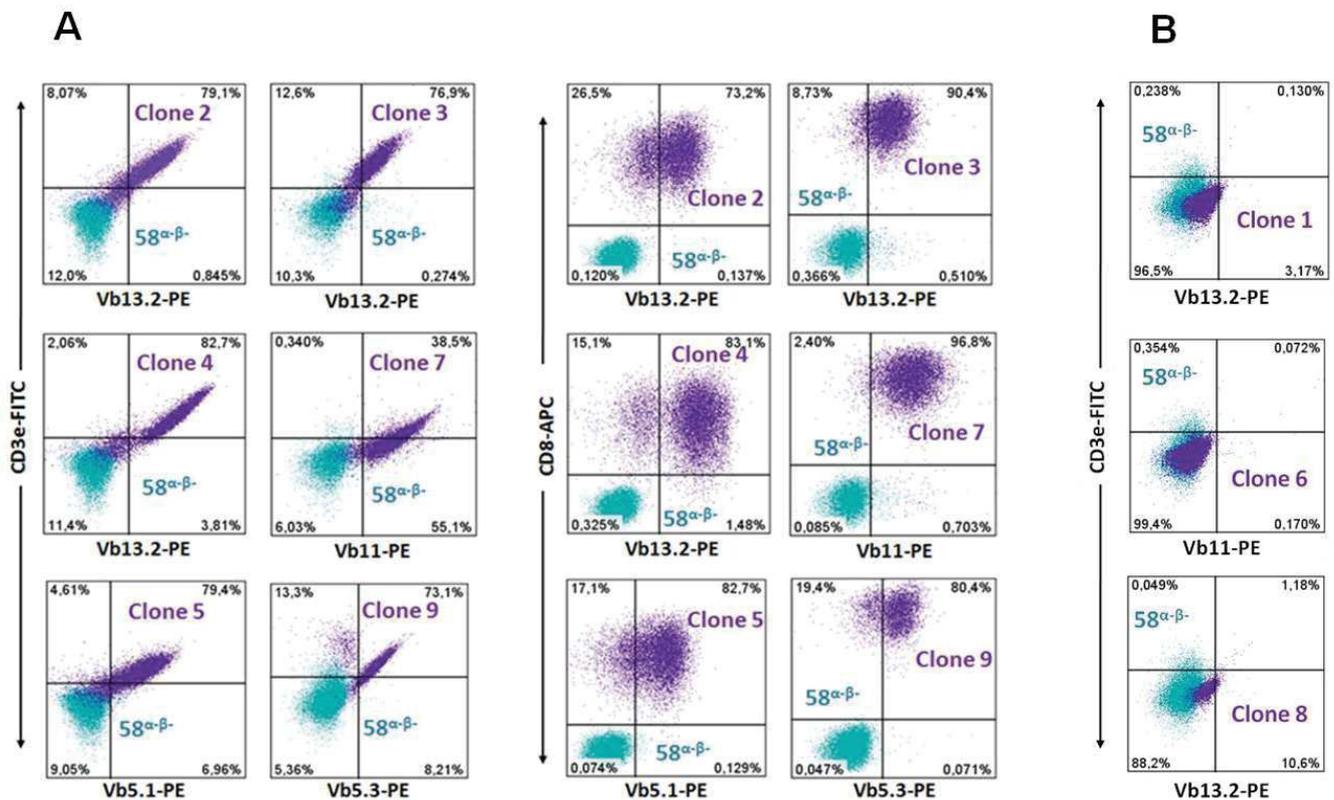


Figure 11 : Validation des clones par cytométrie en flux. Les cellules non transfectées (en bleu clair) et les cellules transfectées (en violet) sont marquées avec du CD3e-FITC (souris), VβX-PE (humain) et CD8-APC (humain). A. Clones avec une co-expression de CD3e, Vβx et CD8. B. Clones n'exprimant pas les marqueurs malgré la transfection.

Le tableau 6 résume les différents modèles de plasmides utilisés en fonction du peptide 2A intégré et leur capacité ou non à obtenir des lignées exprimant le TCR humain et le CD3 de souris à la surface de leur membrane. Pour les clones 2, 4 et 5 c'est le T2A qui a fonctionné. Pour les clones 3, 7 et 9 l'expression du TCR a fonctionné avec le P2A. Les clones 1, 6 et 8 n'ont jamais exprimé de TCR quelque soit le peptide 2A utilisé.

Peptide 2A		T2A	P2A	E2A
Patient MeM	Clone 1			
	Clone 2	OK		
	Clone 3		OK	
	Clone 4	OK		
Patient SoMa	Clone 5	OK		
	Clone 6			
Patient KeBe	Clone 7		OK	
	Clone 8			
MelanA	Clone 9		OK	
Efficacité		33% (3/9)	50% (3/6)	0% (0/3)

Tableau 6 : Efficacité des plasmides testés en fonction du peptide 2A inséré entre la chaîne α et β . Utilisation du T2A puis P2A et E2A. En vert, les plasmides ayant donné des lignées exprimant un TCR humain et le CD3 de souris à la surface de leur membrane. En rouge, les plasmides ayant donné des lignées n'exprimant pas de TCR humain et de CD3 de souris.

Afin de comprendre l'absence d'expression de TCR dans certains cas, nous avons fait une RT-PCR, en suivant le même protocole que l'annexe 2A, sur le clone 9-T2A qui n'exprime pas le TCR à la surface de la membrane afin de savoir si les cellules transfectées exprimaient l'ARNm correspondant. Il s'avère que cette PCR est positive lorsque l'on amplifie la chaîne α . Le problème ne vient pas de l'intégration du plasmide dans la cellule mais est sans doute d'ordre post-translationnel certainement dû à un mauvais clivage du peptide 2A et/ou un problème de clivage du peptide signal de la chaîne α ou β (figure 12).

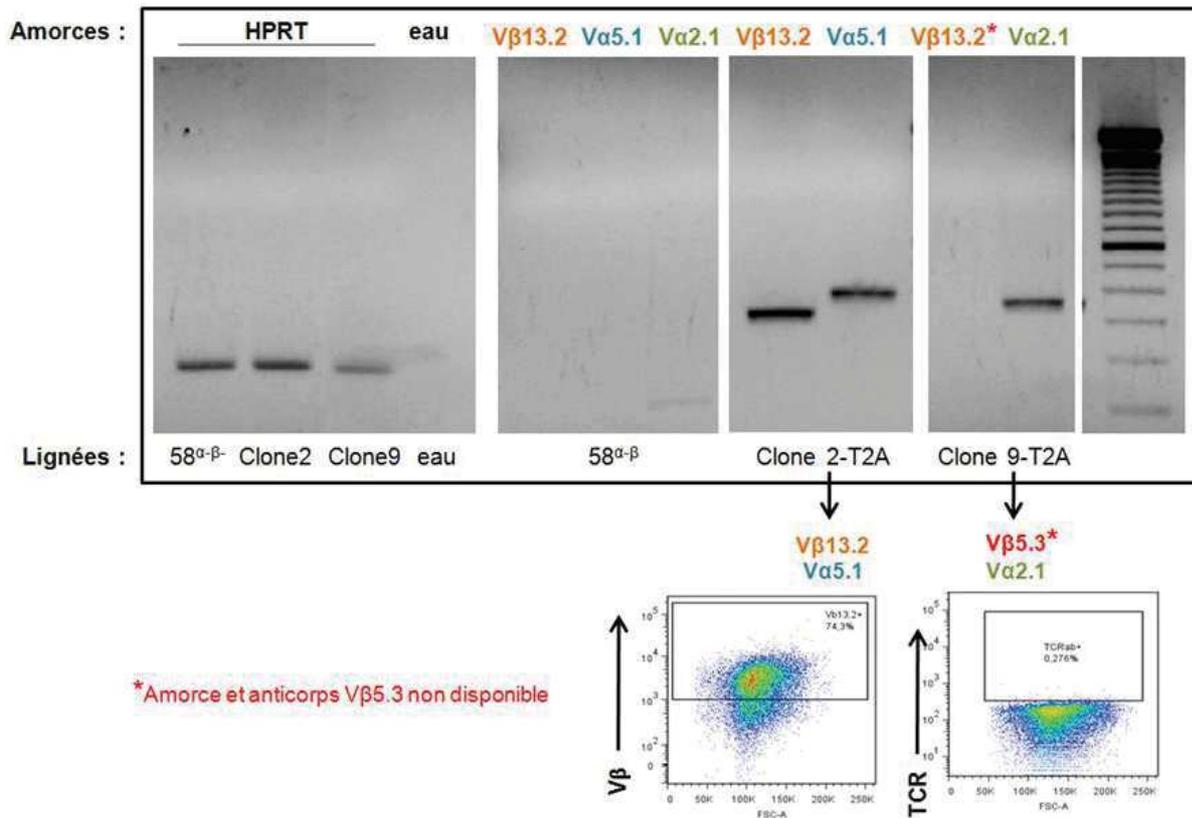


Figure 12 : PCR pour vérification de l'expression de l'ARNm du TCR dans 2 lignées transfectées. Le clone 2 transfecté avec le plasmide T2A exprime à sa surface le V β 13.2 et exprime l'ARNm pour la chaîne α et β correspondante. Le clone 9 transfecté avec le plasmide T2A n'exprime pas à la surface de sa membrane le TCR mais exprime en ARNm la chaîne α de son TCR (à l'époque de ces résultats il n'existait pas d'anticorps et d'amorce pour le V β 5.3).

2.1 Validation de la sécrétion d'IL-2 après activation du TCR

Afin de valider nos lignées nous avons besoin de déterminer si le TCR est bien fonctionnel et qu'il est possible d'activer ces hybridomes via cette voie de signalisation. Pour ce faire, nous avons testé la sécrétion de la cytokine IL-2 par les hybridomes via différentes stimulations.

Un dosage de l'IL-2 par ELISA a été réalisé sur le surnageant de culture des hybridomes afin de vérifier l'activation non spécifique (PMA/ionomycine) et via le TCR (anti-CD3) des hybridomes.

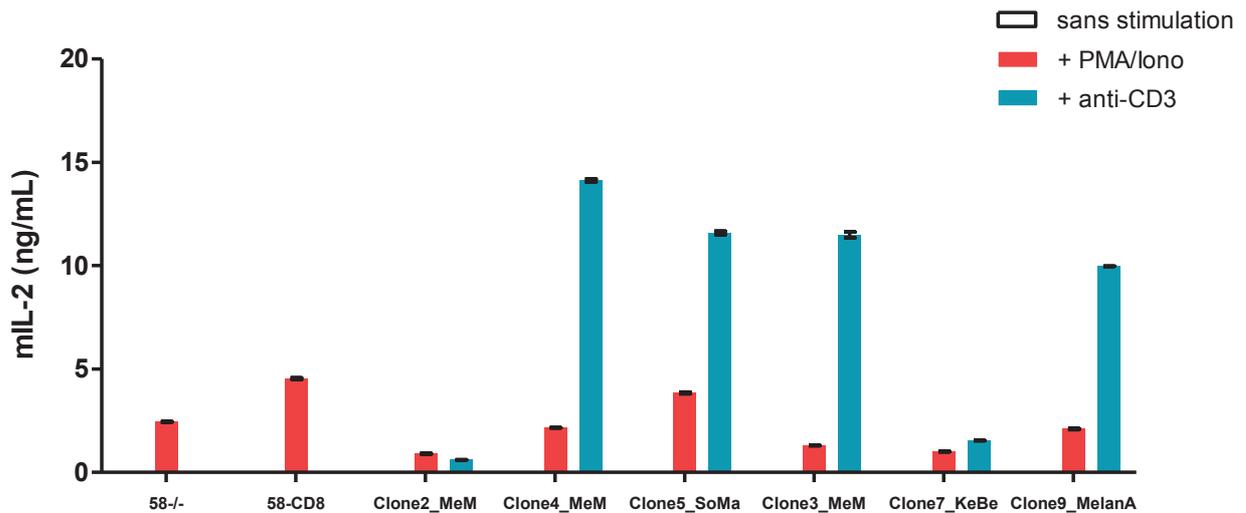


Figure 13 : Dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA. Les différentes lignées (40 000 cellules/puits 96 puits fond rond) ont été incubées pendant 16h avec 20 ng/mL de PMA et 500 ng/mL de Ionomycine dans 200 μ L de milieu complet (rouge) ou sur des puits préalablement recouverts pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, clone :145-2C11) (bleu) ou incubé seulement avec du milieu complet (blanc). Le dosage est effectué sur les surnageants avec le kit ELISA (EZMIL2, Mouse IL-2 ELISA Kit Merck millipore). 58-/- : lignée non transfectée, 58-CD8 : lignée transfectée seulement avec le CD8.

Dans la figure 13, on observe qu'il n'y a aucune sécrétion d'IL-2 lorsque les lignées ne sont pas activées. Lorsque l'on ajoute de la PMA+Ionomycine, toutes les lignées sécrètent de l'IL-2 y compris les hybridomes non transfectés. Dans la condition avec l'anti-CD3, on voit une sécrétion d'IL-2 seulement sur les lignées qui ont été transfectées et pour lesquelles on a confirmé par cytométrie en flux la présence d'un TCR. Cela prouve bien que cette activation passe via le TCR puisque les hybridomes 58 $^{\alpha\beta-}$ et 58-CD8 n'ont pas de TCR, ils ne sécrètent donc pas d'IL-2. Les sécrétions d'IL-2 de chaque clone sont très variables entre 0,6-14 ng/mL. On peut donc en conclure que nos clones possèdent bien un TCR fonctionnel pouvant être activé.

Afin de confirmer par une autre méthode la fonctionnalité du clone 9-Melan-A, nous avons utilisé un tétramère HLA2nNT-Melan-A couplé avec une Streptavidine-APC (Fournit par Karine Bernadeau et produit par la plateforme IMPACT, Nantes). Il nous a semblé intéressant de tester l'effet du tétramère sur nos clones afin vérifier si le clone 9-Melan-A pouvait reconnaître ce tétramère spécifiquement et si celui ci permet ou non d'induire la sécrétion d'IL-2 (figure 14).

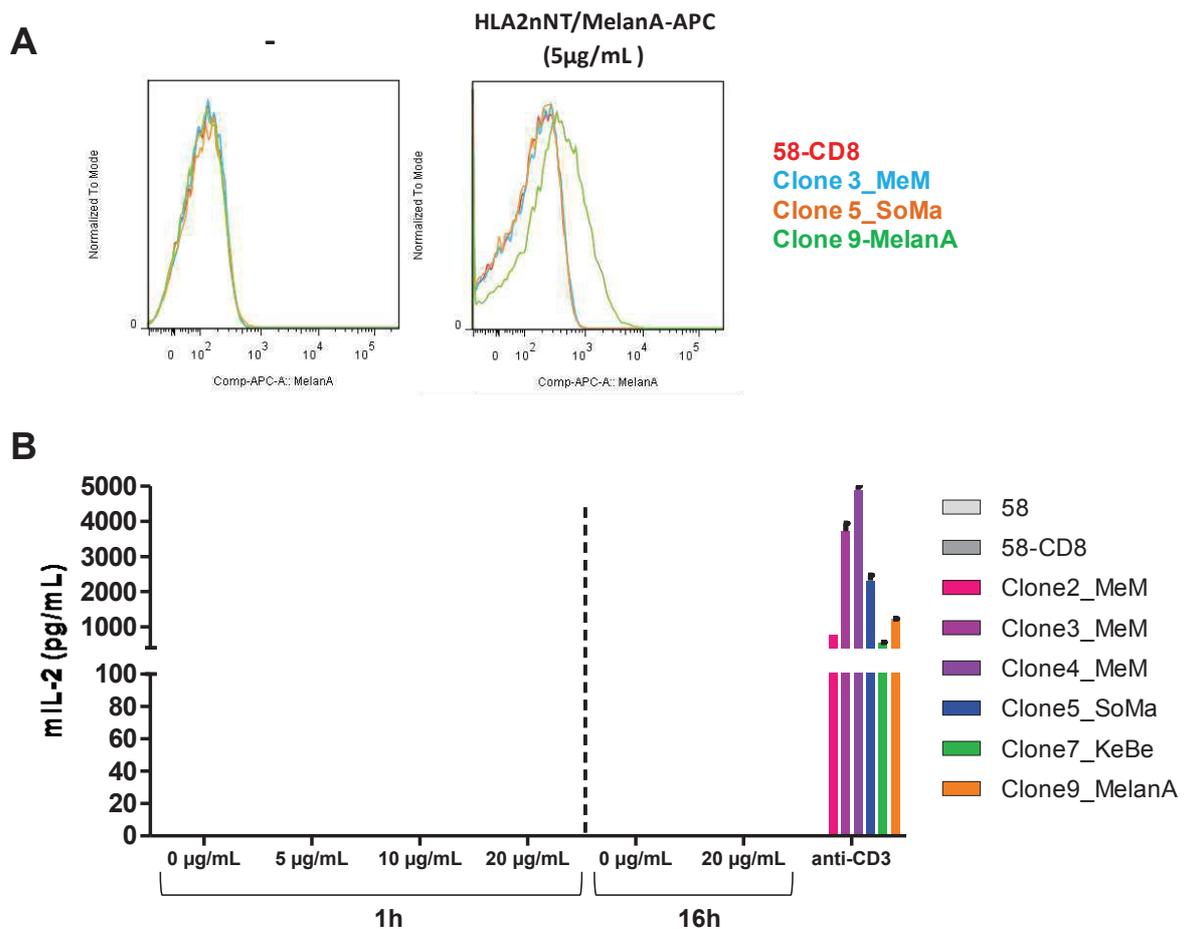


Figure 14 : Utilisation d'un tétramère HLA2nT-Melan-A-APC. A. Marquage 1h des clones 58-CD8, 3,5 et 9 avec le tétramère HLA2nT-Melan-A-APC à la concentration de 5µg/mL. **B.** Dosage par méthode ELISA des surnageants de culture de tous les clones incubés 1h ou 16h avec l'HLA2nT-Melan-A-APC à la concentration de 5, 10, 20 µg/mL. Contrôle d'activation avec des puits préalablement recouvert pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, clone : 145-2C11).

Le clone 9-Melan-A reconnaît spécifiquement le tétramère HLA2nT-Melan-A-APC en faible proportion comparé aux autres clones testés et la reconnaissance seule via ce tétramère n'est pas suffisante pour faire produire au clone de l'IL-2. Nous avons donc confirmé la spécificité du clone 9-Melan-A par cette autre méthode.

3. Reconnaissance antigénique

Nous avons mis en place un modèle *in vitro* permettant de faire exprimer à un hybridome de souris un TCR fonctionnel provenant de clones prédominant au sein d'une famille V β du LCR de patients SEP potentiellement impliqués dans la maladie, l'étape suivante est de trouver leur cible antigénique. Pour cela plusieurs approches ont été mises en place.

3.1 Reconnaissance de peptides de la myéline

Dans une précédente étude (Berthelot et al. 2008b) nous avons déterminé des séquences peptidiques dérivées de protéines de la myéline (la MOG, la MBP et la PLP) pouvant se lier au CMH-I d'une cohorte de patients SEP afin de prédire le peptide pouvant être le mieux présenté au LT CD8⁺ mémoire. Soixante et onze épitopes ont entraîné une réponse de ces LT CD8⁺ mémoires. Cependant, la fréquence n'était pas différente entre les patients et les témoins.

Nous avons à notre disposition ces peptides, nous avons décidé de faire 3 pools dérivés de la MOG (24 peptides), la MBP (37 peptides) et la PLP (10 peptides) afin de tester la spécificité antigénique de nos clones. Nous avons également testé des nouveaux pools commerciaux qui représentent tous les peptides potentiels pour chaque protéine MOG, MBP et PLP. Ce pool est constitué de peptides 15-mer avec des chevauchements de 11-acides aminés, couvrant la séquence complète de l'antigène. Ces pools de peptides sont décrits comme ayant une composition peptidique qui assure la stimulation optimale des LT CD4⁺ et CD8⁺ (peptivator, Miltenyi). Nous avons également ajouté à nos conditions un pool de peptides CEF (CMV, EBV, influenza virus) qui est constitué de 23 peptides viraux humains du CMV, de l'EBV et du virus Influenza restreint au CMH-I afin de voir si nos clones reconnaissent un antigène viral. Après 16h de co-culture nous avons récupéré le surnageant de culture et réalisé un dosage de l'IL-2 par méthode ELISA comme précédemment (figure 15).

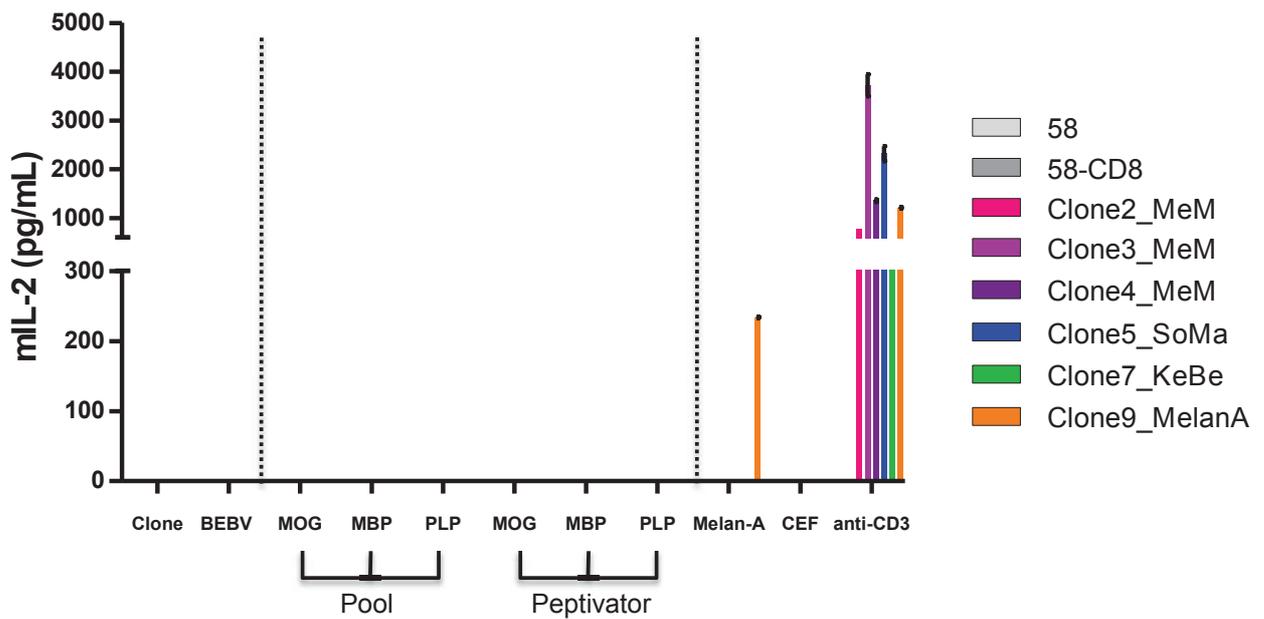


Figure 15 : Sécrétion d'IL-2 en présence de différents peptides dérivés de la myéline. Co-culture des clones et des B-EBV correspondants à un ratio de 1:2 (40 000 : 80 000 - clone : BLCL) avec addition des différents peptides : pool MOG, MBP, PLP, CEF à 10µg/mL; peptivator MOG, MBP, PLP à 6 nmol/peptide ou peptide Melan-A (25-36) à 10µg/mL pendant 16h. Contrôle d'activation avec des puits préalablement recouverts pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, 145-2C11) puis incubation des clones pendant 16h. Dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA.

On observe que tous les clones activés avec de l'anti-CD3 sécrètent de l'IL-2 de souris ce qui prouve la présence à leur surface d'un TCR fonctionnel. A noter également que le clone 9-Melan-A en présence du peptide Melan-A (25-36) produit bien de l'IL-2. Pour ce qui est des tests des pools de peptides aucune sécrétion d'IL-2 de souris n'a pu être visualisée. Nous pouvons en conclure que notre système fonctionne bien puisque le clone 9-Melan-A reconnaît bien son antigène et qu'en présence de celui-ci, il produit de l'IL-2. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de reconnaissance spécifique pour un pool en particulier.

3.2 Reconnaissance de peptides dérivés de protéines apoptotiques

Si les clones de LT CD8⁺ étudiés ne reconnaissent pas un épitope des protéines cibles de la maladie, il est possible qu'ils reconnaissent d'autres épitopes du soi qui pourraient être disponibles lors du début de l'inflammation et de la destruction du tissu.

L'équipe du Pr Vincenzo Barnaba a publié en 2013 une étude qui montre que les LT CD8⁺ de patients HLA-A2 semblent avoir une reconnaissance pour des antigènes dérivés de protéines apoptotiques et que ces LT produiraient plus d'IFN γ et d'IL-17 que chez des témoins. Ces peptides sont des fragments de 9 ou 10 acides aminés dérivés de 8 protéines. L'actine cytoplasmique beta 1 (ACTB), la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène (ROK), la lamelle B1 (LAM1), la chaîne lourde de myosine non musculaire 9 (MYH9), la vimentine (VIME), la sous-unité alpha 1 du protéasome C2 (PSA1), l'inhibiteur de dissociation rho GDP 2 (GDIS) et la sous-unité de la tige latérale aux protéines ribosomales P2 (RLA) (Lolli et al., 2013).

L'hypothèse serait que ces LT CD8⁺ sont recrutés sur le site de l'inflammation et participent activement à l'inflammation via leur production de cytokines. Le Pr Barnaba nous a fourni les différents pools de peptides utilisés dans son étude afin que nous puissions les tester sur nos clones.

Nous avons testé la reconnaissance du clone 5 du patient SoMa qui est HLA-A2 ainsi que sur le clone 3 non HLA-A2 et sur le Clone 9 Melan-A restreint lui aussi au HLA-A2 mais reconnaissant le peptide Melan-A (26-35) (figure 16).

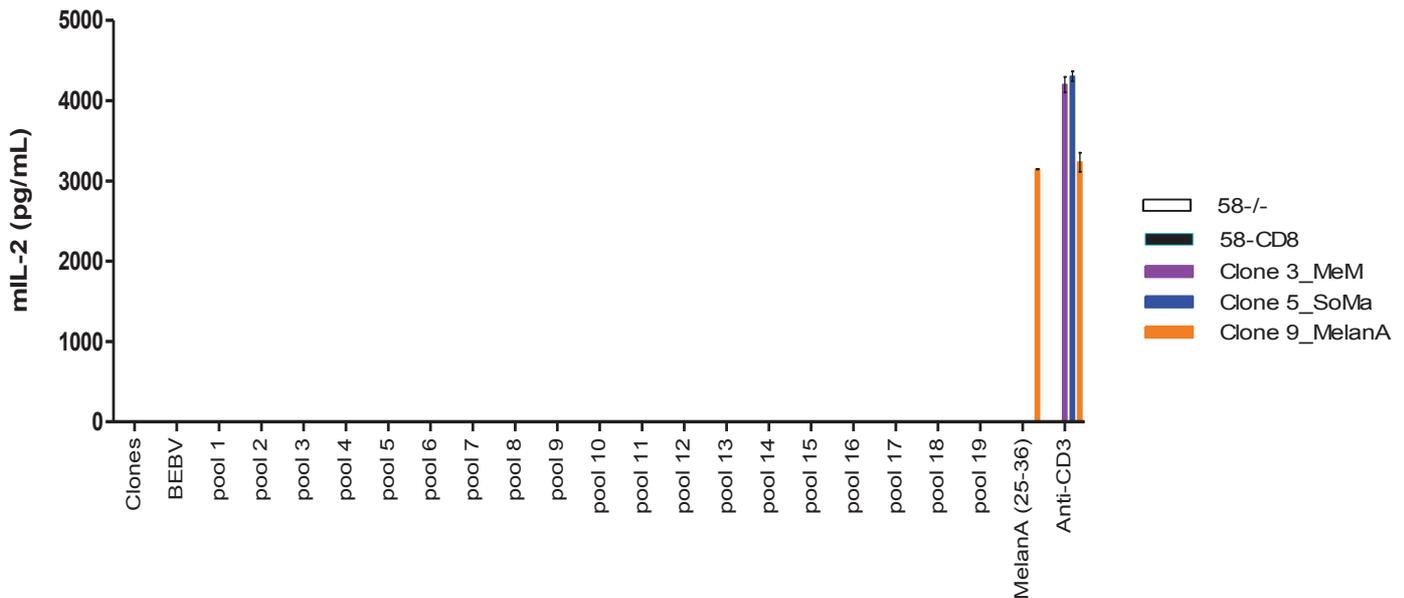


Figure 16 : Sécrétion d'IL-2 en présence de pool de peptides dérivés de protéines associées dans l'apoptose dans un contexte HLA-A2. Co-cultures des clones et des BEBV correspondants à un ratio de 1:2 (40 000 : 80 000 - clone : BLCL) avec addition des pools 1 à 19 à 10µg/mL ou du peptide Melan-A (25-36) à 10µg/mL. Contrôle d'activation avec des puits préalablement recouvert pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, clone : 145-2C11) puis incubation des clones pendant 16h. Dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA.

Comme précédemment, les contrôles avec l'anticorps anti-CD3 ou le Melan-A sont positifs, validant l'expérience. En revanche, aucune production d'IL-2 n'a été observée lors de la présentation des pools des peptides dérivés de protéines apoptotiques. Nous pouvons en conclure que le clone 5 restreint au HLA-A2 ne reconnaît pas les peptides dérivés de protéines apoptotiques présents dans ces pools.

3.3 Reconnaissance de protéines issues de lysats cellulaires du SNC

En l'absence d'engagement du TCR par les différents pools de peptides ci-dessus, nous avons décidé d'utiliser un lysat cellulaire total de lignées cellulaires autologues du SNC, afin de tester la spécificité antigénique de nos clones contre des peptides du SNC de manière plus globale.

Afin d'étudier la reconnaissance à partir de protéines, nous avons besoin de cellules présentatrices pouvant prendre en charge ces protéines. Pour cela nous avons différencié

des monocytes autologues en cellules dendritiques (DC). La différenciation et la maturation des monocytes génèrent des DC dont le phénotype est le suivant : HLA-DR⁺CD209⁺CD40⁺CD83⁺CD80⁺HLA-I⁺. La figure 17 représente la vérification à 6 jours (avant maturation) et 8 jours (post-maturation) de ce phénotype.

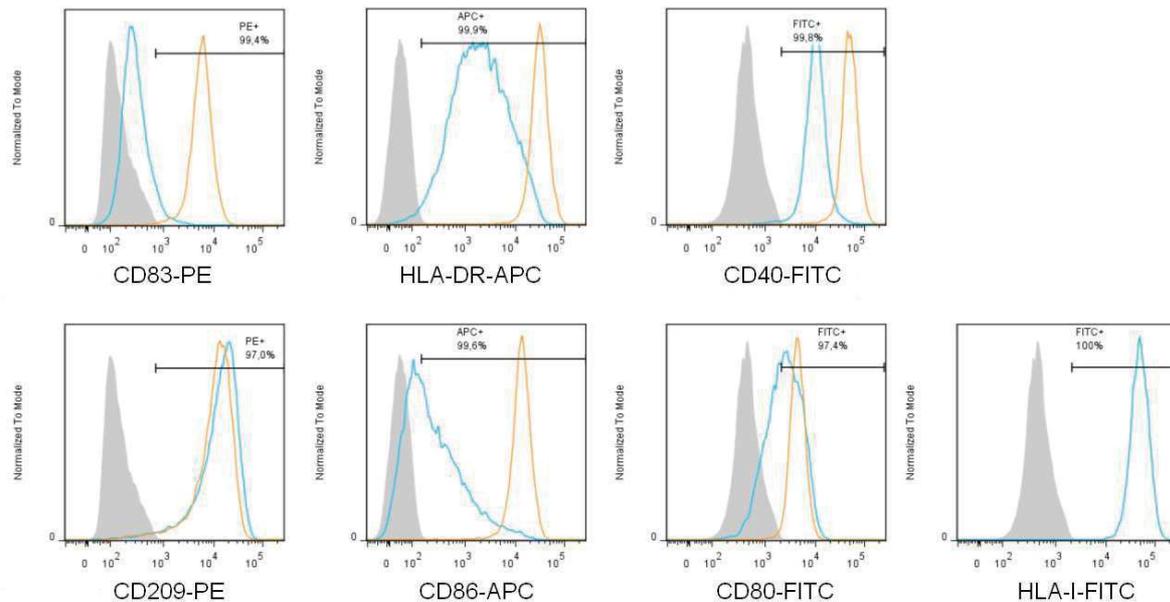


Figure 17 : Vérification des marqueurs de cellules dendritiques après différenciation. Exemple pour le patient KeBe. Marquages CD83-PE, HLA-DR-APC, CD40-FITC, CD209-PE, CD86-APC, CD80-FITC et HLA-I-FITC. En gris : cellules non marquées. En bleu : marquages à J6 avant maturation. En orange : marquages à J8 après maturation avec du LPS.

Nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe du Professeur Renaud Du Pasquier qui dirige le Laboratoire de Neuro-immunologie de Lausanne. Cette équipe a mis au point des protocoles de culture de différenciation d'iPSc (cellules souches pluripotentes induites) afin d'obtenir des lignées neuronales, astrocytaires et oligodendrocytaires. Nous leur avons donc envoyé des PBMC congelés de nos patients afin qu'ils puissent reprogrammer les cellules pour obtenir des lignées cellulaires du SNC dérivées de nos patients.

Ils nous ont envoyé des lysats cellulaires de neurones/astrocytes correspondants à nos trois patients ainsi qu'un lysat cellulaire de cellules de mélanome exprimant la protéine Melan-A. Ces lysats cellulaires ont été testés sur nos clones après incubation avec les DC et l'IL-2 présent dans les surnageants de cultures a été dosé par ELISA (figure 18).

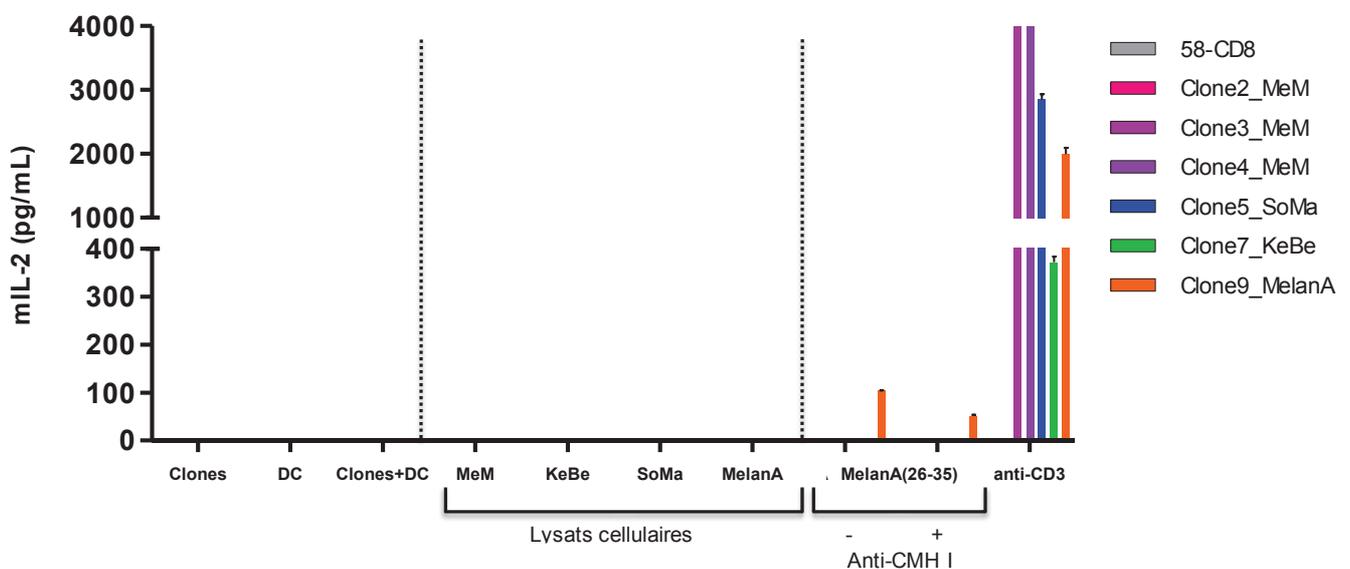


Figure 18 : Sécrétion d'IL-2 en présence de lysat cellulaire de neurones/astrocytes dérivés d'IPSc autologues. Co-cultures des clones avec les DC correspondants à un ratio de 1:5 (20 000 : 100 000 - clone : DC) avec addition des lysats cellulaires à 20 µg/mL ainsi que du peptide Melan-A (25-36) à 10 µg/mL. L'anticorps anti-CMH-I (W6/32) est incubé 30 min à la concentration 1/100. Contrôle d'activation avec des puits préalablement recouvert pendant 2h à 37°C avec un anti-CD3e de souris au 1/100 (BD Biosciences, clone : 145-2C11) puis incubation des clones pendant 16h. Dosage de l'IL-2 de souris par méthode ELISA.

On observe que les clones sont bien activés par l'anti-CD3 ce qui prouve que nos clones ont bien un TCR fonctionnel. On peut voir que le clone 9-Melan-A est activé par le peptide Melan-A (25-36) et que cette activation est diminuée lorsqu'on ajoute un anticorps bloquant anti-CMH-I. Cela montre que l'activation du clone9-Melan-A passe par la présentation de son antigène par les DC. Cependant le lysat cellulaire de la lignée Melan-A ne permet pas d'activer notre clone 9. Il y a plusieurs hypothèses pour expliquer cela. La première serait que le lysat cellulaire Melan-A ne contient pas suffisamment de Melan-A (25-36) pour activer

notre clone. La méthode pour obtenir le lysat cellulaire n'est peut être pas adaptée pour obtenir le peptide immunodominant Melan-A (26-35). Il pourrait également y avoir un problème au niveau de nos DC. En effet, ce sont des cellules qui ont été maturées puis congelées. La décongélation est une étape cruciale pouvant affecter les propriétés des cellules. Il se pourrait que la capacité des DC à phagocyter les protéines pour les présenter ait pu être affectée par cette congélation/décongélation. Des mises au point sont en cours afin d'optimiser ce protocole.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

VIII. Discussion et perspectives

Les différents travaux sur le répertoire ainsi que les travaux du Pr Klaus Dornmair sur la caractérisation du TCR et la mise en place d'un modèle *in vitro* de reconnaissance antigénique, nous ont permis de développer ce projet. Nous avons essayé de simplifier et d'améliorer cette méthode afin d'optimiser la caractérisation des TCR des LT CD8⁺ prédominants au sein d'une famille V β du LCR de patients SEP. En nous affranchissant de l'étape d'amplification des clones contenus dans le LCR, nous avons gagné en temps et en efficacité. Nous avons observé qu'après cette étape d'amplification les clones identifiés comme d'intérêt dans la maladie sur le LCR *ex vivo* n'étaient pas toujours retrouvés. En effet, la prolifération cellulaire est extrêmement régulée notamment via un mécanisme appelé l'AICD (*Activation induced cell death*). Comme dit dans l'introduction, ce mécanisme joue un rôle important dans la régulation de la délétion des LT autoréactifs (Green et al., 2003). Ainsi lorsque l'on veut justement étudier ces LT autoréactifs il semble judicieux d'éviter toute activation de ceux-ci afin de ne pas les faire rentrer en apoptose.

L'isolement des clones via le sang nous a permis d'augmenter la quantité de cellules à étudier et a confirmé une nouvelle fois nos résultats publiés sur les similarités existants entre le LCR et les LT CD8⁺ du sang, justifiant ainsi l'étude via le sang des LT CD8⁺ infiltrants le SNC. Nous avons également optimisé et validé la production d'un plasmide codant pour les chaînes α et β permettant l'expression fonctionnelle du TCR dans des hybridomes de souris. En incluant un peptide 2A entre les deux chaînes nous avons pu créer un seul plasmide pour l'expression des 2 chaînes et ainsi obtenir un TCR fonctionnel permettant d'avoir un modèle simple de visualisation de l'activation du TCR par l'antigène.

Dans le cadre de la SEP, la localisation de la maladie est un frein dans l'étude des LT infiltrants le cerveau. Grâce à notre technique nous pouvons, par le biais du LCR, étudier des clones prédominants pouvant jouer un rôle important dans le début de la maladie. Les clones que nous avons pu identifier chez deux patients SEP et un patient CADASIL, n'ont pour le moment pas permis d'identifier d'antigènes impliqués dans la SEP. Nous avons commencé notre étude par des antigènes dérivés de la myéline classiquement étudiés dans cette maladie, mais aucun des clones n'a reconnu de peptides dérivés de la MOG, MBP ou

PLP. Dans la SEP plusieurs hypothèses s'affrontent sur la physiopathologie de la maladie et son déclenchement. L'hypothèse que ces LT CD8⁺ ne reconnaissent pas un antigène dérivé de la myéline mais plutôt un antigène résultant d'une inflammation primaire laissant accessible des antigènes dérivés de protéines apoptotiques peut être envisagée. Dans de nombreuses infections virales comme le HIV ou l'hépatite C le clivage caspase-dépendant des antigènes associés aux cellules apoptotiques joue un rôle important dans les réponses et la prolifération des LT CD8⁺ autoréactifs (Rawson et al., 2007; Franceschini et al., 2012). Cependant les peptides dérivés des protéines apoptotiques fournis par le Pr Vincenzo Barnaba n'ont pas activé nos clones.

Notre collaboration avec le Pr Renaud Du Pasquier va nous permettre de continuer ce projet d'identification d'un auto-antigène pour nos clones. Grâce à leur technologie de production d'IPSc et la différenciation en lignées du SNC, nous avons un nouveau modèle d'étude de la reconnaissance de LT CD8⁺ prédominants au sein d'une famille V β dans le LCR par leurs propres cellules du SNC. Cette méthode va nous permettre d'étudier la reconnaissance de nos clones *in vitro* sur des lignées neuronales, astrocytaires et oligodendrocytaires pour avoir l'opportunité de déterminer si les LT CD8⁺ reconnaissent une cible cellulaire particulière. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus avec les lysats cellulaires de neurones/astrocytes n'ont pour le moment pas donné les résultats escomptés mais plusieurs mises au point sont en cours de réalisation afin de pouvoir montrer que le système fonctionne. Des tests sur des DC non congelées sont en cours actuellement. L'équipe du Pr Du Pasquier a réussi à obtenir les lignées neuronales et astrocytaires et est actuellement en train de mettre en place les lignées oligodendrocytaires. Des résultats préliminaires sur le clone 9 Melan-A cultivé sur des cellules de mélanome exprimant la protéine Melan-A montrent que cette co-culture entraîne la sécrétion d'IL-2 du clone 9 donc une reconnaissance antigénique. Une fois les lignées du SNC finalisées, il faudra s'assurer qu'elles puissent exprimer le CMH-I pour être cocultivées avec nos clones de LT CD8⁺. Différentes cocultures seront effectuées en présence ou non de molécules pro-inflammatoires afin d'observer la reconnaissance de nos clones.

Une des perspectives de ce projet sera d'essayer de trouver une méthode plus sensible que la sécrétion d'IL-2 pour déterminer la spécificité antigénique. Dans le futur nous voudrions

compléter notre méthodologie comme celle utilisée par l'équipe du Pr Dornmair (Siewert et al., 2012). Dans cette étude, ils ont effectué une transfection supplémentaire, à leur clones exprimant le TCR et le CD8, avec un plasmide NFAT-GFP (*nuclear factor of activated T cells*) selon la méthode d'identification de l'antigène cible schématisée dans la figure 19.

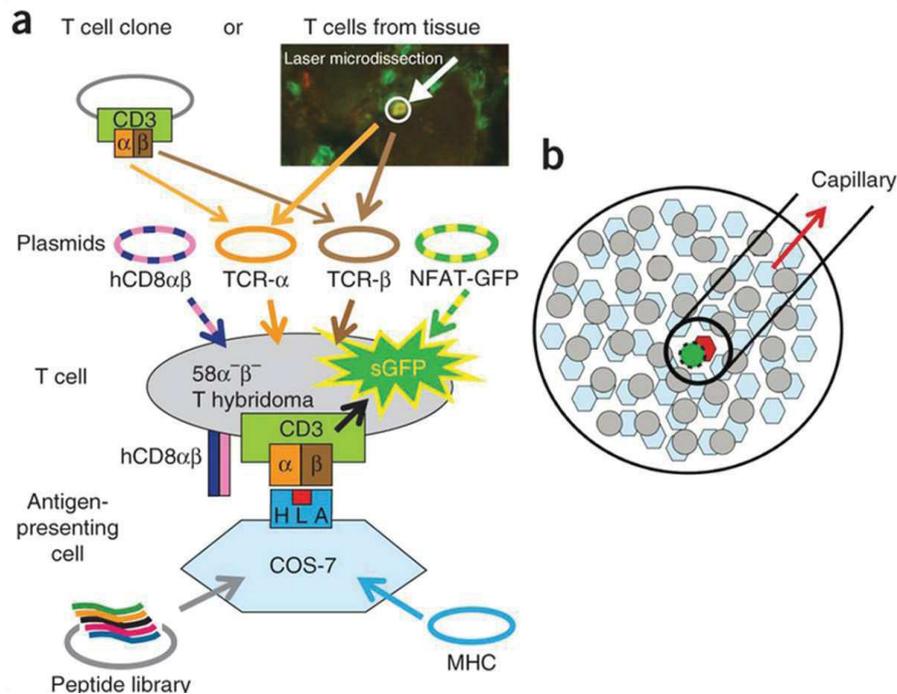


Figure 19 : Aperçu schématique de la stratégie expérimentale (Siewert et al., 2012). **A.** Les hybridomes 58 $\alpha\beta^{-}$ sont transfectés avec les plasmides d'expression pour le CD8 humain (hCD8 $\alpha\beta$), la chaîne α (TCR α), la chaîne β (TCR β) à étudier et le NFAT-GFP. Pour les cellules présentatrices d'antigène, ce sont des cellules COS-7 qui ont été co-transfectées de manière transitoire avec la molécule HLA appropriée (*MHC*) et avec une librairie de peptides combinatoires codée par un plasmide (*peptide library*). Cela entraîne l'expression de molécules de CMH (carré bleu) à la surface des cellules COS-7 liées à un peptide antigénique (rouge). Ce complexe est reconnu par le TCR, ce qui entraîne la synthèse de sGFP par l'hybridome. **B.** Une coculture des hybridomes transfectés peut être réalisée avec les COS-7. L'hybridome transfecté par le TCR qui est en contact direct avec une cellule COS-7 présentant un mimotope reconnue par le TCR est activé et allumé en vert. Cela permet d'isoler sous un microscope à fluorescence et à l'aide d'un capillaire la COS-7 ayant présenté le bon peptide pour ensuite le cloner et le séquencer.

Les protéines de la famille NFAT sont exprimées dans la plupart des cellules immunitaires et jouent un rôle important dans la transcription de gènes de cytokines (par exemple l'IL-2, l'IFN γ et le TNF α) et d'autres gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Rao et al., 1997). Des vecteurs d'expression ont été construits contenant plusieurs sites de liaisons-NFAT avec des gènes rapporteurs pour LacZ et ils ont montré que la transfection de ce vecteur dans des

lignées T faisait exprimer LacZ via l'activation du TCR (Karttunen et al., 1992). Par la suite le vecteur d'expression a été amélioré afin de lui ajouter un gène rapporteur GFP pour visualiser et isoler plus facilement des lymphocytes T activés par un antigène (Hooijberg et al., 2000). Cet outil pourrait nous permettre de tester de nouveau nos antigènes afin de confirmer ou d'infirmer qu'il n'y a aucune réponse contre ceux-ci. Il faudra pour cela regarder l'expression de la GFP par nos clones en présence des différents peptides cibles. Si cela s'avère inefficace, nous pourrions ensuite mettre en place un système en co-transfectant un plasmide contenant une librairie combinatoire de peptides de 9 aa aussi appelé *plasmid-coded combinatorial nonamer peptide library* (PECP) ainsi qu'un plasmide correspondant au CMH-I de chaque clone dans des cellules COS-7. Ces cellules seront utilisées comme cellules présentatrices d'antigènes et cette librairie permettra de regarder un plus grand nombre de peptides à la fois.

Le mécanisme moléculaire de cette maladie auto-immune est toujours peu connu. Depuis de nombreuses années différentes équipes cherchent la cible pouvant expliquer le déclenchement de la maladie. Beaucoup de travaux ont étudié les anticorps présents chez les patients SEP et de nouvelles approches sont actuellement en train de voir le jour. Les avancées de la recherche permettent maintenant par exemple d'effectuer des puces permettant de cartographier à haute résolution tout le protéome afin d'essayer de trouver les cibles antigéniques génératrices d'auto-anticorps qui pourraient être spécifiques à la SEP (Zandian et al., 2017). Cette cartographie est réalisée en utilisant le sérum ou le plasma de patients afin de visualiser la spécificité peptidique de tous les anticorps présents dans ces échantillons. Cet outil permet actuellement de tester plus de 2,2 millions de peptides de 12aa avec 6aa de décalage par échantillon. Grâce à cela ils ont ensuite sélectionné les peptides de 12 aa les plus intéressants afin de concevoir une puce ciblée contenant 174 000 peptides avec 1 aa de décalage. Ils ont fini par utiliser des billes recouvertes de 133 peptides. Cette étude a permis de mettre en évidence deux potentiels nouveaux auto-antigènes MAP3K7 dans la SEP et NRXN1 dans la narcolepsie. MAP3K7 est aussi connue sous le nom de TAK1 (*TGFβ-activated kinase 1*) et joue un rôle crucial dans la cascade d'inflammation mais son rôle *in vivo* n'a pour le moment pas encore été totalement déterminé (Ajibade et al.,

2013). Dans l'EAE, la déplétion de la MAP3K7 dans les cellules microgliales semble diminuer l'inflammation et la démyélinisation dans le SNC (Goldmann et al., 2013).

D'autres pistes pourraient être envisagées pour continuer à étudier ces LT autoréactifs. Un séquençage à haut débit du TCR des cellules du LCR pourrait être effectué afin d'étudier la totalité des LT et surtout la fréquence de chacun d'entre eux. Cette méthode permettrait de choisir vraiment tous les clones surreprésentés dans le LCR. Des nouvelles méthodes sur cellule unique sont actuellement en plaine expansion et permettent d'étudier de plus en plus de paramètres simultanément. Il y a la technologie microfluidique (Fluidigm) permettant d'étudier 96 paramètres sur 96 cellules, le RNA-sequencing permettant de séquencer la totalité du transcriptome d'une cellule ou même des protocoles permettant de combiner, pour une même cellule, l'analyse du TCR ainsi que 34 paramètres phénotypiques (Phetsouphanh et al., 2015). Toutes ces avancées technologiques donnent de bons espoirs dans l'avancée des recherches sur les LT.

Dans la SEP, nous comprenons petit à petit les étapes du dérèglement du système immunitaire et les cellules immunitaires impliquées ainsi que certains des mécanismes de dégradation de la myéline. En revanche, les étapes de déclenchement de la maladie restent toujours obscures. En travaillant sur des patients lors de leur syndrome cliniquement isolé, premier événement clinique de la maladie, nous essayons d'éclaircir ces étapes précoces et cruciales dans la survenue et l'établissement de la maladie chez ces patients. L'étude et l'identification de la cible antigénique de ces LT CD8⁺ prédominants dans le LCR des patients à ce moment de la maladie est cruciale pour mieux comprendre les mécanismes de la physiopathologie de la SEP.

ANNEXES

IX. Annexes

Annexe 1 : Expanded CD8 T cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis



RESEARCH ARTICLE

Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis

Marion Salou^{1,2,a}, Alexandra Garcia^{1,3,a}, Laure Michel^{1,4,a}, Anne Gainche-Salmon¹, Delphine Loussouarn⁵, Bryan Nicol^{1,2}, Flora Guillot^{1,2}, Philippe Hulin⁶, Steven Nedellec⁶, Daniel Baron^{1,2,3}, Gérard Ramstein⁷, Jean-Paul Soullillou¹, Sophie Brouard^{1,3}, Arnaud B. Nicot^{1,2,3}, Nicolas Degauque^{1,3,b} & David A. Laplaud^{1,4,8,b}

¹INSERM, UMR 1064, Nantes F-44093, France

²Medicine Department, Nantes University, Nantes F-44035, France

³Nantes Hospital, ITUN, Nantes F-44093, France

⁴Neurology Department, Nantes Hospital, Nantes F-44093, France

⁵Pathology Department, Nantes Hospital, Nantes F-44093, France

⁶SFR François Bonamy, Cellular and Tissue Imaging Core Facility (MicroPICell), Nantes F-44093, France

⁷LINA UMR6241, Nantes University, Nantes F-44093, France

⁸INSERM 004, Centre d'Investigation Clinique, Nantes F-44093, France

Correspondence

David A. Laplaud, INSERM UMR 1064, 30 Bd J. Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France.
Tel: +33 240087410; Fax: +33 240087411;
E-mail: david.laplaud@univ-nantes.fr

Funding Information

This work has been funded by the ARSEP Foundation and in the framework of the "Paris Scientifiques" supported by the Région Pays de Loire. It was also realized in the context of the IHU-Cesti project, which received French government financial support managed by the National Research Agency via the "Investment Into The Future" program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de Loire Region.

Received: 25 February 2015; Accepted: 3 March 2015

doi: 10.1002/acn3.199

^aThese authors contributed equally to the work.

^bBoth senior authors, listed by alphabetical order.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS), characterized by the infiltration of immune cells, especially perivascular T

Abstract

Objective: In multiple sclerosis (MS), central nervous system (CNS), cerebrospinal fluid (CSF), and blood display TCR clonal expansions of CD8⁺ T cells. These clones have been assumed – but never demonstrated – to be similar in the three compartments. Addressing this key question is essential to infer the implication of peripheral clonally expanded CD8⁺ T cells in the disease. **Methods:** For the first time, TCR V β repertoire from paired blood (purified CD8⁺ and CD4⁺ T cells), CSF and CNS (22 lesions, various inflammatory and demyelination statuses) samples from three MS patients was studied using complementary determining region 3 (CDR3) spectratyping and high-throughput sequencing. In parallel, blood and CNS clonally expanded CD8⁺ T cells were characterized by fluorescent staining. **Results:** TCR V β repertoire analysis revealed strong sharing of predominant T-cell clones between CNS lesions, CSF, and blood CD8⁺ T cells. In parallel, we showed that blood oligoclonal CD8⁺ T cells exhibit characteristics of pathogenic cells, as they displayed a bias toward a memory phenotype in MS patients, with increased expression of CCR5, CD11a and Granzyme B (GZM-B) compared to non oligoclonal counterparts. CNS-infiltrating T cells were mainly CD8 expressing CD11a and GZM-B. **Interpretation:** This study highlights the predominant implication of CD8⁺ T cells in MS pathophysiology and demonstrates that potentially aggressive CD8⁺ T cells can be easily identified and characterized from blood and CSF samples.

cells and macrophages.¹ To date, exchanges of immune cells between the CNS and the periphery remain poorly characterized. In the recent years, repertoire analyses have been widely used to understand better these processes, especially for B-cell dynamics. The study of the immu-

noglobulin variable region heavy chain repertoire by high-throughput sequencing revealed that B-cell clones were shared between CNS, cerebrospinal fluid (CSF) and blood of MS patients, with clonal diversifications occurring in the three compartments.^{2,3} Recently, two other studies suggested that memory B cells migrate in a bidirectional way between the CSF and the blood, and that the first maturation events occur in the cervical lymph nodes.^{4,5} Concerning T cells, only two studies reported that particular CD8 clones identified in brain biopsies could also be found in CSF and blood several years later in two patients.^{6,7} Most of the other studies focused on either CNS or peripheral compartments. Indeed, we and others have shown that the brain-infiltrating T cells display a restricted oligoclonal TCR repertoire, and that expanded infiltrating clones are mainly present in the CD8⁺ T-cell subpopulation.^{6,8,9} This restricted oligoclonal TCR repertoire suggests antigen-driven selection or activation processes. In other patients, the TCR repertoire in periphery was shown to be more biased in MS patients than in healthy volunteers (HV),^{10,11} especially for CD8⁺ T cells.¹² The CSF TCR repertoire has been described to be even more biased than the one of the blood,^{13–15} with accumulation of memory CD8⁺ T cells.¹⁴ Interestingly, repertoire skewing in the blood and in the CSF was correlated with clinical or MRI activity of the disease, suggesting that expanded CD8⁺ T cells could be directly involved in the pathological process and that blood may reflect local inflammatory events.^{11,16,17} However, whether the expanded peripheral clones are representative of the ones found in brain lesions, and thus maybe implicated in the disease process, remains unknown. This would be of great interest since access to peripheral T cells is obviously easier.

In this work, we studied unique paired biological samples, that are, purified blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells, CSF T cells, and brain lesions retrieved from three MS patients. The TCR repertoire was compared for these three compartments by spectratyping and high-throughput sequencing. Interestingly, the CSF repertoire almost completely mirrored that of the CNS, which was also closer to the blood CD8 repertoire than to the blood CD4 one. Phenotypic characteristics of expanded circulating CD8⁺ T cells were compared in MS patients and in HV. Oligoclonal CD8⁺ T cells from the blood of relapsing-remitting patients displayed a preferential central-memory (CM) phenotype with increased homing and cytotoxic abilities. Brain-infiltrating CD8⁺ T cells also expressed homing and cytotoxicity markers. Altogether, these data support the implication of blood CD8⁺ T cells with clonal expansions in the disease process. Finally our work shows that CSF and blood samples could be used as a source of clonally expanded CD8⁺ T cells found at the lesion sites, and potentially implicated in the disease process.

Material and Methods

Patients and HV

Demographic and clinical characteristics of all the donors are summarized in Table 1. Three deceased MS patients were included for comparison of the TCR V β repertoires in the blood, CSF, and CNS. Four other patients with relapsing-remitting MS and four HV were included for phenotypic comparisons between circulating CD8⁺ T cells belonging to V β families with Gaussian or oligoclonal complementary determining region 3 length distributions (CDR3-LD). For all the patients, MS was diagnosed according to the MacDonald 2005 criteria.¹⁸ Informed consent for donation was obtained in compliance with our local University hospital ethical committee and the principles expressed in the Helsinki Declaration. Sample collection was declared at the Biomedicine Agency, identification number PFS13-003. HV were enrolled by the Etablissement Français du Sang (EFS) within the context of a research contract.

For the three deceased MS patients, brain and spinal cord were frozen at -80°C . One part of these samples was stored in formol (VWR, Radnor, PA). Histological analysis by a neuropathologist (D. Loussouarn) confirmed MS diagnosis. Blood was collected by intracardiac puncture. (PBMC) Peripheral Blood Mononuclear Cells were isolated by Ficoll density centrifugation (Eurobio Les Ulis, France) and stored in liquid nitrogen. CSF samples (30–50 mL) were obtained by puncture in the *cisterna magna* to avoid blood contamination. CSF cells were collected by centrifugation and stored frozen in Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). For the patient 1 (MS 1), PBMC were also collected 1 month before death.

PBMC from four relapsing-remitting untreated MS patients and four HV were frozen as described above. The patients had an active disease, that is, presented at least one gadolinium-enhancing lesion on a brain MRI scan in the previous 3 months and at least one severe relapse in the previous year.

Lesion characterization of autopsy material

Ten micrometer serial sections from the cryopreserved brains and spinal cords were stained with Luxol Fast blue, Hematoxylin-Eosin-Safran, anti-CD3, anti-CD68, and anti-HLA-DR (antibodies description in Table S1). Lesions were classified as active (demyelination and homogeneous inflammatory infiltrate), chronic active (demyelination and inflammatory infiltrate at the surroundings), normal-appearing white matter (NAWM) (inflammatory infiltrate without demyelination), and meningeal (infiltrate mainly localized in the meninges). Classification was

Table 1. Demographical and clinical characteristics of the patients and HV at sampling.

Patient	Age	Gender	Disease duration (years)	Disease type	EDSS	In the preceding year		Death-sampling interval	Cause of death	Treatments history	Last treatment-sampling interval	HLA typing
						Number of Gd ⁺ lesions	Number of relapses					
MS 1	45	M	12	SP	8.5	0	0	12 h	Lung cancer	Azathioprine-Cyclophosphamide Mitoxantrone-Interferon Methotrexate	24 months	A*0301/2402 B*0702/0761/1402 DRB1*0102/1501 DQB1*0501/0602
MS 2	66	F	10	PP	7.5	0	0	6 h	Pulmonary infection	None	Treatment naive	A*0201/3201 B*0702/0761/3501(3542) DRB1*1101/1302 DQB1*0301(0322)/0604(0639)
MS 3	54	F	23	PP	9	0	0	8 h	Pulmonary infection	Mitoxantrone	120 months	A*0101/1101 B*0801/4403 DRB1*0301(0350)/1301 DQB1*0201/0603
MS 4	33	M	1	RR	4	6	2	N/A	N/A	None	Treatment naive	-
MS 5	33	F	10	RR	2.5	0	2	N/A	N/A	Glatiramer acetate	3 months	-
MS 6	39	F	20	RR	4	1	1	N/A	N/A	Azathioprine	5 months	-
MS 7	48	M	26	RR	3	1	1	N/A	N/A	MMF	2 months	-
HV 1	47	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HV 2	28	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HV 3	37	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HV 4	52	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

For HLA typing, the number in parenthesis is the rare alleles that cannot be excluded from the typing. Gd, gadolinium; MS, multiple sclerosis; F, female; M, male; N/A, not applicable; HV, healthy volunteers; EDSS, expanded disability status scale; MMF, mycophenolate mofetil.

cross-checked by a neuropathologist (D. Loussouarn). The number of 10 μm sections necessary to obtain at least 15,000 T cells, as described to perform a representative TCR repertoire,⁸ was lysed in Trizol (Invitrogen). Serial sections stained with LFB, anti-CD3 and anti-CD68 confirmed that the collected tissue belonged to the lesion.

TCR V β repertoire analyses

After thawing, PBMC were labeled with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, and DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (antibodies described in Table S1). Viable CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated (purity >98%) with a high-speed cell sorter (FACS ARIA, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Total RNA was extracted from Trizol lysates of the blood purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells, from the CSF cells and from the CNS sections, according to the manufacturer's recommendations. RNA concentration and integrity were checked using a spectrophotometer (ND-1000; Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA Agilent[®], Santa Clara, CA, USA) and a picoRNA Chip (Agilent[®]), respectively.

RNA from the autopsy samples (200 ng for the CD4⁺ or CD8⁺ T cells, 400 ng for the CSF cells) was reverse-transcribed using SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. For the blood of patients and HV, reverse-transcription (400 ng of starting material) was performed with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Poly (dT) were used for the blood and CSF cells, and a specific primer hybridizing in the C β region¹⁹ for the CNS sections, to increase the sensitivity. CDR3 was amplified by PCR in a 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in separate reactions using a common reverse C β primer and different forward V β -specific primers (Table S2). Two semi-nested PCRs were performed with the same forward primers but using firstly Taq-Polymerase GOLD (Applied Biosystems) and a reverse primer "SpTy-b-out,"³⁸ and secondly, Taq-Polymerase (Invitrogen) and a reverse primer "CBR".²⁰ PCR conditions¹² and V β primers²⁰ for the blood cells of patients and HV have been previously described. For the autopsy samples, the V β primers' list was modified to increase the number of studied V β families. Primer sequences are listed in Table S2. Primers were named according to the Arden classification.²¹ A run-off reaction was performed on the PCR products, using a FAM-tagged C β primer.²² The CDR3-LD was determined with an AB3037 DNA sequencer (Applied Biosystems) and analyzed using GeneMapper software (Applied Biosystems). A software was developed to automatically describe individual TCR V β profiles and to compare the TCR V β usage across the different biological compartments.

The CDR3-LDs were described as monoclonal (major peak >80% and all the others <10%), oligoclonal (≤ 4 peaks >5% each), polyclonal with major peak (>4 peaks, major peak >40% and twice as much as the second major peak), polyclonal or Gaussian (other distributions, polyclonal when shifted from the Gaussian distribution) (see Fig. S1A for examples).

Comparison of TCR V β repertoires

In order to evaluate changes in CDR3-LD between the different compartments of a given patient, comparisons of all the V β families were made in pairs. For each V β family, the CDR3-LD was compared by different methods (see Fig. S1B for examples):

- A *correlation coefficient* was calculated by first plotting the percentages of each CDR3 length for the two compartments compared (one point per CDR3 length, the point abscissa and ordinate are the percentages for the first and the second compartment, respectively). A linear correlation is then determined. The higher the correlation coefficient, the stronger the similarities between the two distributions are.
- A *distance score* was calculated as the mean of the differences peak by peak between two CDR3-LD: $\sum_{i=1}^{12} |x_i - y_i| / 12$, x and y being the peaks heights (in percentage) of the two compared CDR3-LD, and i the 12 CDR3 lengths. The smaller the distance score, the closer two distributions are. The correlation coefficient and the distance score were very effective at distinguishing close or very different distributions, but not those in between. Hence, a rater-dependent method was also used.
- A *similarity score* was attributed to every comparison by three blinded independent raters (M. S., A. G., and D. A. L.) to classify the distributions as different (0), different but with identical major peak (1), similar (2), or identical (3). The final classification was obtained with a consensus for at least two raters.

Proximity of the overall repertoire of peripheral compartments (CSF and blood) and CNS lesions was also assessed. A reference CDR3-LD (one blood or CSF V β family of one patient) was selected, and distances from this reference profile were computed over all the other CDR3-LD, regardless of their V β families. This was repeated independently for all the V β profiles selected as reference. The existence of a similarity pattern between peripheral and CNS compartments, and thus a propensity of intra-V β family distances to be shorter than inter-V β family ones, was assumed. A Wilcoxon Rank Sum test was used to validate this assumption and a Benjamini & Hochberg correction was applied to account for multiple comparisons.

Finally, the similarity relationship between the CDR3-LD profiles was estimated. To each CNS profile, as well as blood and CSF profiles, was associated a label corresponding to its compartment. For each patient and for each $V\beta$ family, the median Euclidean distance was computed between all possible label pairs. Taking this distance matrix between pairs of labels as input, a Multidimensional Scaling was performed, resulting in a 2D representation of the respective positions of the compartments. In this representation, the labels proximities reflect the degree of similarity between their CDR3-LD.

Direct sequencing

For $V\beta$ families with one overrepresented CDR3 length, sequencing was performed on the PCR product from the seminested PCR performed for the spectratyping. The specific $V\beta$ or the common $C\beta$ ("CBR") primers were used for the sequencing on an AB3037 DNA sequencer (Applied Biosystems). Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, QLD, Australia) was used for analysis.

High-throughput sequencing

Remaining cDNA samples of blood (patient MS 3) or blood and CSF (patients MS 1 and 2) were used for high-throughput sequencing. T cells from blood samples collected before death were used for MS 1. In parallel, cDNA was produced from two lesions from each patient (lesions 3, 4, 7, 8, 17, and 20), as described in the sections "Lesion characterization of autopsy material" and "TCR $V\beta$ repertoire analyses". Amplification and sequencing of TCRB CDR3 regions was performed using the immunoSEQ platform (Adaptive Biotechnologies, Seattle, WA). ImmunoSEQ combines multiplex PCR with high-throughput sequencing and a sophisticated bioinformatics pipeline for quantitative $V\beta$ CDR3 region analysis.^{23,24} Similarity represents the overlap between unique nucleotide sequences and their frequency calculated as the sum of overlapping sequences divided by sum of all sequences. Clonality is a measurement of the shape of the frequency distribution of all productive clones in a sample, 0 being a flat distribution and 1 being an entirely oligoclonal sample.

Phenotypic analysis of clonally expanded blood CD8⁺ T cells

CD8⁺ T cells and specific $V\beta$ CD8⁺ T cells characterized by Gaussian or mono/oligoclonal CDR3-LD were analyzed by multicolor flow cytometry. Directly coupled antibodies against the following antigens were used: CD3, CD8, CD45RA, CD197 (CCR7), CD27, CD28, CCR5, CD11a (LFA1), granzyme B (GZM-B), and specific anti- $V\beta$. Antibodies characteristics are listed in Table S1. Dead

cells were excluded from the analysis using LIVE/DEAD Fixable Aqua stain (Invitrogen) according to the manufacturer's guidelines. For intracellular staining, cells were stained for viability and extracellular markers, permeabilized and fixed with Perm/Fix reagent (BD Biosciences), before labeling with the appropriate antibody. Samples were acquired with a LSRII (BD Bioscience) on FACS DIVA software (version 6.1.3; BD Biosciences) and analyzed with FlowJo Software, LCC., Ashland, OR, USA (V7.6.5).

Immunofluorescence on autopsy samples

Ten μm frozen sections were thawed, fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) in PBS, rinsed in PBS and incubated with 10% normal goat serum (Sigma-Aldrich) in PBS to prevent non-specific staining. Sections were stained with anti-CD3, anti-CD8, and one of the following antibodies: anti-CD11a, anti-GZM-B (antibodies characteristics in Table S2). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in PBS 10% normal goat serum. The corresponding secondary antibodies were incubated for 2 h at room temperature in PBS 10% normal goat serum. After a 10-min incubation in PBS containing 1% DAPI, slides were mounted using Prolong Antifade Reagent (Invitrogen).

Sections were observed on an Axiovert 200 m microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany PerkinElmer, Waltham, MA, USA), at a 20 \times (NA0.75) optic magnification. Images were acquired in a sequential mode with an AxioCamR camera using Axiovision Software from Zeiss, Oberkochen, Germany. Forty to 80 pictures were taken, and 125–1351 CD3⁺ T cells were counted (mean of 345 cells). CD3⁺ T cells were counted with the Velocity software (V. 6.2; PerkinElmer).

Statistics

Statistics were performed using PRISM software (V5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and dedicated R package. For the repertoire comparison, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the correlations and the distances, followed by a Bonferroni's multiple comparison test. When comparing two groups (MS patients vs. HV, immunofluorescence), a Mann–Whitney test was performed. $P < 0.05$ was assumed as significant.

Results

TCR repertoire comparisons reveal strong similarities between blood CD8⁺ T cells, CSF T cells, and CNS-infiltrating T cells

To study whether the repertoire biases present in the blood or in the CSF reflect the biases in the CNS of MS

patients, we compared the TCR repertoire from paired samples of blood (CD4⁺ and CD8⁺ sorted T cells), CSF, and CNS lesions of three MS patients (clinical and demographical information in Table 1). For each patient, six to eight lesions were identified and classified as active, chronic active, meningeal, or NAWM (Table 2; see Methods section for classification criteria). Then, for each patient, the CDR3-LD of each Vβ family was compared across the different compartments using CDR3 spectratyping method and/or high-throughput sequencing (see Material and Methods section). Classification of CDR3-LD is presented in Figure S1 (see Method section for classification criteria). Selection of T-cell clones appeared to be private as the alignment of the sequences between the patients failed to reveal any matches, which is consistent with different HLA class I and II usage across the patients (Table 1; only one identity for one HLA-B between MS 1 and 2).

To quantify whether blood and CSF repertoires reflected the one of the lesions, the distance distribution between blood, CSF, and CNS CDR3-LD profiles was analyzed (Fig. 1A). The graph represents the capacity of CSF and blood profiles to closely approximate a CNS CDR3-LD from the same Vβ family. Compared to blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells, CSF T cells specifically match more profiles issued from the same Vβ family of the

CNS. Using a *q*-value threshold of 5%, this discriminative power concerned more than two-thirds of the Vβ families for the CSF, and approximately one-third for blood compartments (Fig. 1A). In parallel, we focused on mono and oligoclonal CDR3-LD of blood or CSF, which are easily identifiable from a blood or a CSF sample on living patients. Each mono/oligoclonal CDR3-LD was compared to the same Vβ family CDR3-LD of each lesion of the same patient, using the similarity score described in Method section (score 0/1 for different CDR3-LD, 2/3 for similar CDR3-LD) (Fig. 1B). Compared to the blood

Table 2. Characteristics of the investigated lesions.

Patient	Lesion	Anatomical location	Classification
MS 1	1	Parietal WM	Active
	2	Optic nerve	Active
	3	Frontal WM	Chronic active
	4	Parietal WM	Chronic active
	5	Lumbar spinal cord	Meningeal
	6	Optic nerve	NAWM
MS 2	7	Frontal WM	Active
	8	Cervical spinal cord	Active
	9	Cerebellar WM	Chronic active
	10	Optic nerve + meninges	Meningeal
	11	Meninges	Meningeal
	12	Frontal WM	NAWM
MS 3	13	Corpus callosum (frontal)	NAWM
	14	Frontal lobe	NAWM
	15	Frontal WM	Active
	16	Frontal WM	Active
	17	Frontal WM	Active
	18	Cerebellar WM	Active
	19	Spinal cord	Active
	20	Cerebellar WM	Chronic active
	21	Cerebellar WM	Chronic active
	22	Optic nerve	NAWM

MS, multiple sclerosis; WM, white matter; NAWM, normal appearing white matter.

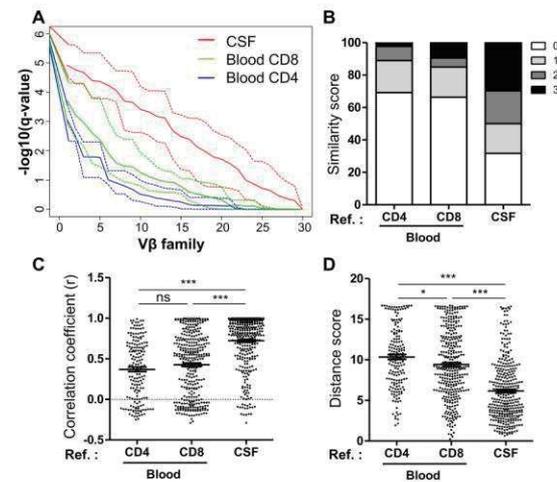


Figure 1. CSF TCR repertoire is closer to the one of the CNS than the blood TCR repertoire. The repertoire was studied by CDR3 spectratyping. (A) The ordered *q*-value vector (*y*-axis) obtained for a reference profile (blood or CSF) over all the Vβ families (*x*-axis) are represented in the graph, as described in Methods. This represents the capacity of CSF (red) and blood (green for CD8 and blue for CD4) CDR3-LD to closely approximate a CNS CDR3-LD from the same Vβ family. The solid and the dotted lines indicate the median *q*-value vector and the minimum/maximum *q*-value vector, respectively. (B–D) Monoclonal and oligoclonal Vβ families from the blood and the CSF were compared to the corresponding families in the CNS. The comparisons were performed as described in Methods, using a similarity score (B), a correlation coefficient (C), and a distance score (D). Each dot represents a comparison for one Vβ between the reference compartment and a lesion. The number of comparisons (172 for the blood CD4, 339 for the blood CD8 and 350 for the CSF) depends on the number of monoclonal and oligoclonal families of the blood and of the CSF. Data are pooled for all the lesions and for the three patients. Data are presented as percentage of total in (A), and with mean ± SEM in (B and C). One-way ANOVA was performed to compare the correlations and the distances, followed by a Bonferroni’s multiple comparison test (B and C). **P* < 0.05, ****P* < 0.0001. CSF, cerebrospinal fluid; CNS, central nervous system; CDR3, complementary determining region 3; CDR3-LD, CDR3 length distribution.

mono/oligoclonal CDR3-LD, the CSF mono/oligoclonal CDR3-LD reflected more the infiltrating T cells profiles. Indeed 50% of Vβ families with a mono/oligoclonal CDR3-LD in the CSF exhibited similar or identical CDR3-LD in CNS lesions (similarity score of 2 and 3). Besides, the mono/oligoclonal CDR3-LD of blood CD8+ T cells were closer to the CNS lesions repertoire than were mono/oligoclonal CDR3-LD of blood CD4+ T cells (15.04% and 11.05% of scores 2 and 3, respectively). Objective scores confirmed these observations. Indeed, CSF Vβ families with mono/oligoclonal CDR3-LD were more correlated with (Fig. 1C, *P* < 0.001) and less distant from (Fig. 1D, *P* < 0.001) the same CNS Vβ family CDR3-LD than those from blood CD8+ or CD4+ T cells. Of note, the distance was smaller for blood CD8+ than blood CD4+ T cells (Fig. 1D; *P* < 0.05).

High-throughput sequencing was performed to extensively analyze the repertoire of blood, CSF and two lesions for each of the three MS patients (summary of samples sequencing in Table S3). The similarity based on sequence counts is presented in Figure 2. As

concluded from the CDR3 spectratyping comparison, the CSF repertoire is closer to the lesion repertoire than the blood one (median % similarity: 82%, 44% and 10% for CSF, blood CD8+, and blood CD4+ T cells, respectively). Moreover, these data highlight a greater proximity of the blood CD8 repertoire with the one of the lesions, as compared to the blood CD4 repertoire, for the three MS patients. This is consistent with the fact that, among the 100 most predominant clones in the lesions studied, a median of 40 (min-max: 29–57) were also found in the CD8 compartment, whereas only 13.5 (min-max: 9–37) could be attributed to the CD4 subset.

We then assessed the number of blood or CSF predominant clones that were also predominant in CNS lesions. For each patient, the number of Vβ families with mono/oligoclonal CDR3-LD from blood or CSF that were similarly present in at least one CNS lesion was determined. The results are presented in Table 3. A Vβ family with mono/oligoclonal CDR3-LD in the CSF was present in the CNS at a frequency of almost 80%. This

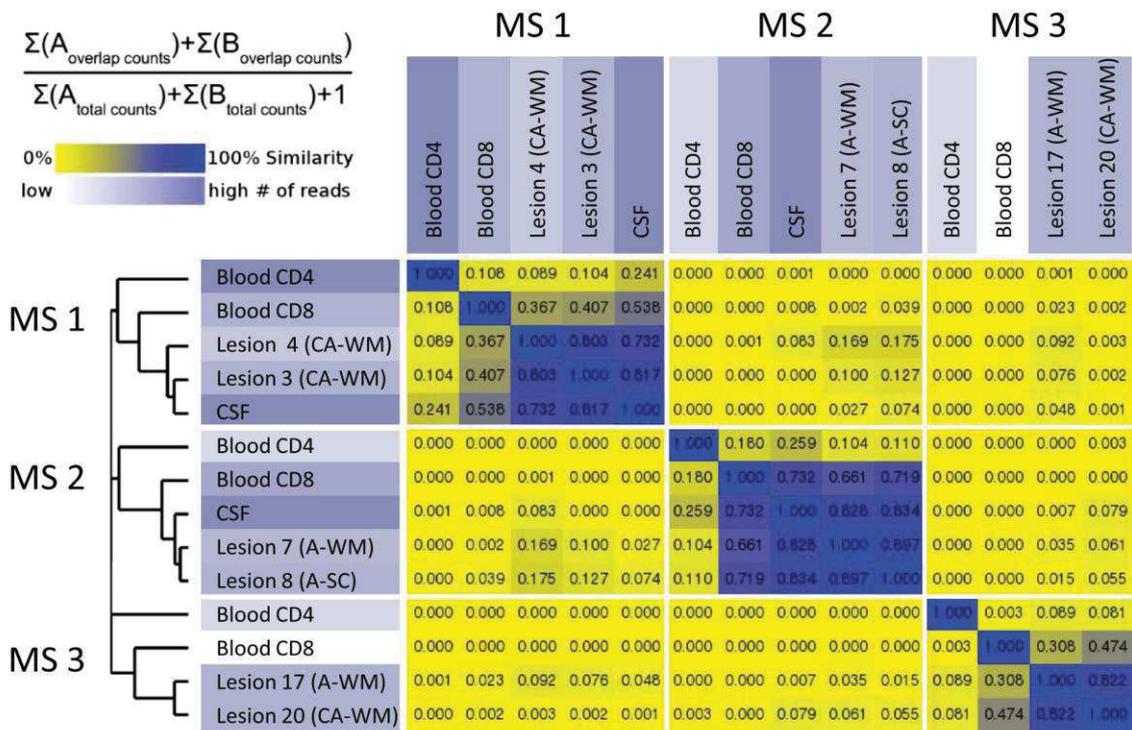


Figure 2. In single patients, the TCR repertoire of the CNS is closer to the CSF and then to the blood CD8 compartment. The TCR repertoire was studied by high-throughput sequencing. Similarity of samples is displayed, based on sequence counts, according to the formula. Very similar samples are plotted in blue, whereas dissimilar ones are yellow. CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; CA, chronic active; A, active; WM, white matter; SC, spinal cord.

Table 3. Expanded clones comparison between the periphery and the CNS.

Patient	Technique	Blood CD4 → CNS	Blood CD8 → CNS	CSF → CNS
MS 1	CDR3 spectratyping ¹	30% (3/10)	43% (6/14)	78% (7/9)
	High-throughput sequencing ²	5.0%	27.5%	72.5%
MS 2	CDR3 spectratyping ¹	23% (3/13)	43% (10/23)	70% (14/20)
	High-throughput sequencing ²	7.5%	37.5%	95.0%
MS 3	CDR3 spectratyping ¹	25% (1/4)	23% (3/13)	90% (18/20)
	High-throughput sequencing ²	2.5%	47.5%	ND
Total	CDR3 spectratyping ¹	26.0%	36.0%	79.0%
	High-throughput sequencing ²	5.0%	37.5%	84.0%

CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; MS, multiple sclerosis; CDR3, complementary determining region 3.

¹Number of mono/oligoclonal profiles from the periphery that are similar in at least one lesion (based on the similarity score).

²Percent of the 20 most represented clones in the periphery that are among the 100 most represented clones in the two lesions.

decreased to 36% for blood CD8⁺ T cells and to 26% for blood CD4⁺ T cells. Sequencing of the spectratyping products from families with mono/oligoclonal CDR3-LD (235 sequences of functional TCRs were obtained from the different compartments) sustained the same conclusion (sequences details in Table S4). High-throughput sequencing not only confirmed these results but also provided a quantitative approach unavailable with the CDR3 spectratyping analysis. Indeed, when looking at the 20 most represented clones in the CSF, in the blood CD8⁺ and CD4⁺ T cells, 84%, 37.5% and 5% were present, respectively, among the 100 most represented clones of the lesions.

Interestingly, clones expanded both in CSF and blood CD8⁺ compartment are very likely to be expanded also in the CNS. Indeed, for the three patients, of seven V β families with the same mono/oligoclonal pattern both in CSF and CD8⁺ T cells, five were also present in at least one CNS lesion with a similar pattern. This is further supported by the results of the high-throughput sequencing: when considering the 20 clones predominant in blood CD8⁺ T cells or in CSF T cells, 25% are identical, and all of these identical clones belong to the 100 clones predominant in at least one of the lesion studied (4/4 for both lesions of MS 1, 6/6 and 5/6 for the two lesions of MS 2).

The CSF T cell repertoire closely reflects that of the meninges and the optic nerves

By comparing CDR3 spectratyping data, we found that peripheral repertoire biases (CSF or blood T cells) were not representative of a particular lesion type (Figs. 3A–C, and S2). Multidimensional scaling representation was used to plot the distance between CDR3-LD profiles in connection with their anatomical locations and their belonging to particular lesion types (Fig. 3D). This confirmed that the peripheral repertoire was not representa-

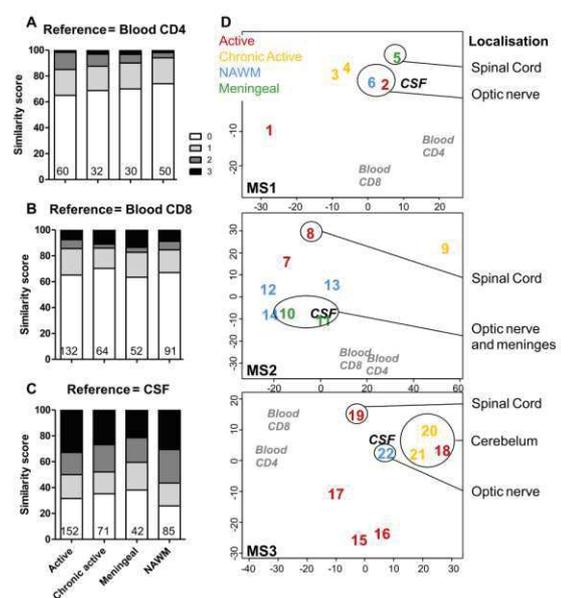


Figure 3. TCR repertoire of the CSF mirrors better that of the meninges and the optic nerves. The similarity score (as in Fig. 2) is presented for the blood CD4⁺ (A) and CD8⁺ T cells (B), and the CSF T cells (C), but separating the CNS lesions according to their pathological status (active $n = 9$, chronic active $n = 5$, meningeal $n = 3$, NAWM $n = 5$). The number of comparisons performed is indicated at the bottom of the graph. Data are presented as percentage of total in (A–C). (D) Multidimensional Scaling visualization using median Euclidian distance between all possible pairs of CDR3-LD as input. For each patient, blood CD4⁺, blood CD8⁺, CSF, and the different CNS lesions (numbered 1–22, as in Table 2) are represented. The color code stands for the lesion type: active (red), chronic active (yellow), NAWM (blue), meningeal (green). CSF, cerebrospinal fluid; CNS, central nervous system; NAWM, normal-appearing white matter; CDR3-LD, complementary determining region 3 length distribution.

tive of a particular lesion type, but suggested that the CSF repertoire was most similar to optic nerves and meninges repertoires for the three patients.

Different CNS lesions in single patients displayed the same alterations

Similarity based on sequence counts after high-throughput sequencing revealed high proximity between the lesions studied (80% for MS 1, 90% for MS 2, and 82% for MS 3). These results can be extended to all CNS lesions studied by CDR3 spectratyping, especially when considering V β families with mono/oligoclonal CDR3-LD (data not shown).

Of note, some of the most abundant sequences in the brain lesions were not abundant in the periphery, especially in blood CD4⁺ T cells. Indeed, over the 20 most represented sequences in the lesions, a median of 77.5%, 17.5%, and 0% were present in the 100 predominant sequences in the CSF, in the blood CD8 and CD4, respectively.

Expanded circulating CD8⁺ T cells in MS patients are biased toward a CM and a TEMRA phenotype

As ~40% of blood CD8⁺ T cells with clonal expansions corresponded to families with mono/oligoclonal CDR3-LD in the CNS, we wondered whether these T cells had a specific phenotype that could suggest their involvement in the disease process, or their preferential migration into the CNS. CDR3 spectratyping was performed on the blood CD8⁺ T cells of four MS patients and four HV. Some V β families with mono/oligoclonal CDR3-LD for which V β antibodies were available were phenotypically studied. Using the naïve marker CD45RA and the chemokine receptor CCR7 (Fig. 4A), the populations were classified as naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), CM (CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory (EM; CD45RA⁻CCR7⁻) and terminally differentiated EM cells expressing CD45RA (terminally effector memory RA positive [TEMRA]; CD45RA⁺CCR7⁻).²⁵ First, as compared to HV, the overall V β families of MS patients displayed a less naïve phenotype, being more differentiated into the memory subsets (Fig. 4B and C, $P < 0.01$ for the decrease in naïve cells in MS V β families with Gaussian or mono/oligoclonal CDR3-LD as compared to HV V β families with Gaussian CDR3-LD). In MS patients, CD8⁺ T cells from V β families with Gaussian CDR3-LD preferentially exhibited an EM phenotype, whereas CD8⁺ T cells from V β families with mono/oligoclonal CDR3-LD were more differentiated into CM and TEMRA cells (Fig. 4B and C).

Circulating CD8⁺ T cells with clonal expansions have an increased expression of homing and cytotoxicity markers

CCR5 and CD11a (as part of the LFA1 integrin) have both been suggested to be implicated in the migration

into the CNS.^{26,27} Families with mono/oligoclonal CDR3-LD from MS patients harbored higher expression of CCR5 than V β families with Gaussian CDR3-LD from the same patients (Fig. 4D and E) (median: 40.30% vs. 22.10%, $P < 0.05$). These expanded CD8⁺ T cells from MS patients expressed higher levels of CD11a (median: 76.80% vs. 64.80%) and GZM-B (median: 42.40% vs. 23.60%) (Fig. 4D and E) compared to their Gaussian counterparts. Altogether, these data suggest that V β families with mono/oligoclonal CDR3-LD from MS patients are biased toward a CM and a TEMRA phenotype, with more pronounced homing and cytotoxic markers than families with Gaussian CDR3-LD.

Lesion-infiltrating CD8⁺ T cells express homing and cytotoxicity markers

Almost 40% of clonally expanded blood CD8⁺ T cells were found in the CNS lesions, and we report that in the blood they display specific activated/homing/cytotoxic characteristics. We thus wondered whether the phenotype of the lesion-infiltrating CD8⁺ T cells was similar to the one in the periphery. Most lesion-infiltrating CD8⁺ T cells belong to V β families with mono/oligoclonal CDR3-LD, allowing an indirect assessment of the phenotype of clonally expanded CD8⁺ T cells in situ. In addition to CD3, CD8 and DAPI, CD11a, or GZM-B were stained on serial tissue sections by immunofluorescence. CD8⁺ T cells outnumbered CD8⁻ T cells in the 22 lesions of the three patients: 66.93% (median) of the infiltrating CD3⁺ T cells were positive for CD8, as compared to 33.07% (median) negative for CD8 (Fig. 5A, $P < 0.001$). CD8⁺ T cells were predominant in all types of lesions (Fig. 5B). At least half of the infiltrating T cells (CD8⁺ or CD8⁻ T cells) expressed CD11a (50–80%, Fig. 5C and D). Lesion-infiltrating CD8⁺ T cells expressed higher levels of CD11a than CD8⁻ T cells (median: 67.60% vs. 55.35%, $P < 0.05$), especially in active and chronic lesions (Fig. 5E). Finally, GZM-B-expressing infiltrating CD8⁺ T cells were identified (Fig. 5F), highlighting their cytotoxic potential in situ. Collectively, these results suggest that CNS-infiltrating T cells are mainly CD8⁺ T cells with clonal expansions that express homing and cytotoxic markers.

Discussion

Our study is the first to compare the repertoire of the lesion-infiltrating T cells against that of the CSF and the blood in MS patients. TCR repertoire was studied both by CDR3 spectratyping and high-throughput sequencing, the latter allowing an extensive sequence analysis. We show that the CSF T-cell repertoire is very close to the

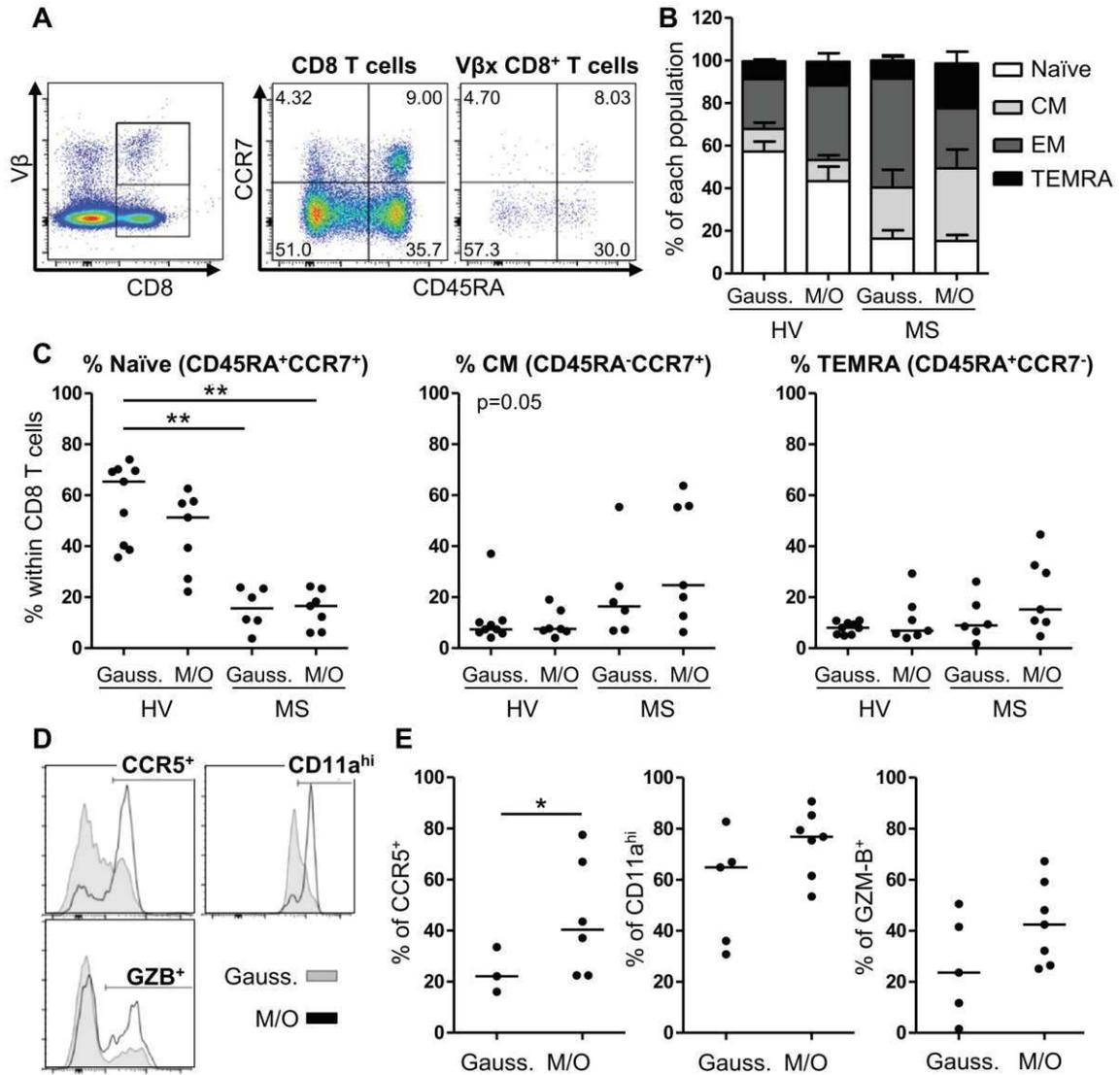


Figure 4. CD8⁺ T cells from Vβ families with mono/oligoclonal CDR3-LD from MS patients are biased toward the CM/TEMRA phenotype and express CCR5, CD11a (LFA1) and GZM-B. The phenotypes of blood CD8⁺ T cells belonging to Vβ families with mono/oligoclonal and Gaussian CDR3-LD were compared. (A) Representative dot plot staining on CD8 and on Vβ specific CD8⁺ T cells for CD45RA and CCR7. Gates were drawn according to the total CD8 population. (B) Proportions of the different subsets defined by the CD45RA-CCR7 staining for HV and MS Vβ families with mono/oligoclonal (M/O) (*n* = 7 for HV and MS) or Gaussian (Gauss.) (*n* = 9 for HV, *n* = 6 for MS) CDR3-LD. (C) Quantification of the naïve and CM subsets for HV and MS Vβ families with mono/oligoclonal (M/O) or Gaussian (Gauss.) CDR3-LD. The line indicates the median. A Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s Multiple comparison test were performed. ***P* < 0.01. (D and E) Histogram of one representative patient and quantification of the CCR5, CD11a^{high} and GZB expression on CD8⁺ T cells from Vβ families with Gaussian (Gauss.) and mono/oligoclonal (M/O) CDR3-LD, for the different patients studied. The line indicates the median. A Mann–Whitney test was performed to compare two groups. **P* < 0.05, ***P* < 0.01. CDR3-LD, complementary determining region 3 length distribution; MS, multiple sclerosis; CM, central memory; TEMRA, terminally effector memory RA positive; GZM-B, granzyme B; HV, healthy volunteers.

one found in the CNS lesions. Up to 43% of blood circulating CD8⁺ T cells with clonal expansions are also found in the CNS lesions. In the blood, CD8⁺ T cells with clonal

expansions display a memory phenotype, biased toward the CM and TEMRA phenotype with an overexpression of CCR5 and CD11a. In addition, CNS-infiltrating T cells

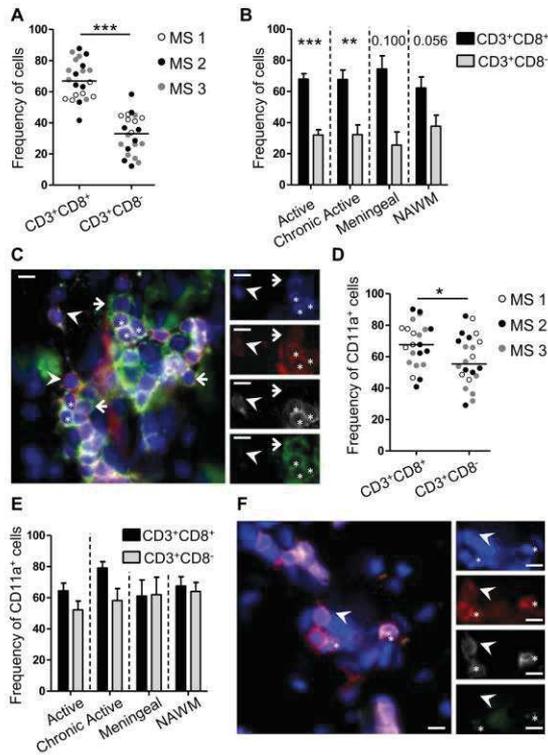


Figure 5. Infiltrating T cells are mainly CD8⁺ T cells and express CD11a and GZM-B. Immunofluorescent staining was performed on 22 lesions from three MS patients. (A and B) Frequency of CD8⁺ and CD8-T cells within CD3⁺ T cells in the lesions according to the patient (A) and to the lesion type (active $n = 9$, chronic active $n = 5$, meningeal $n = 3$, NAWM $n = 5$) (B). (C) Example of staining with CD3 (red), CD8 (white), DAPI (blue), and CD11a (green). (D and E) For CD11a, quantification according to the patient (D) and to the lesion type (E) is presented, as described in (A). (F) Example of staining with CD3 (red), CD8 (white), DAPI (blue), and GZB (green). Arrowheads show CD3⁺CD8⁺ T cells negative for the green marker. Arrows and stars show, respectively, CD3⁺CD8⁻ and CD3⁺CD8⁺ T cells positive for the green marker. The line on the pictures indicates 20 μm . On the dot plot, the median is indicated. On the histograms, mean \pm SEM is presented. A Mann-Whitney test was performed to compare two groups. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GZM-B, granzyme B; MS, multiple sclerosis; NAWM, normal-appearing white matter.

are mainly CD8⁺, with 2/3 expressing CD11a⁺. Taken together, these results strongly suggest the involvement of peripheral clonally expanded CD8⁺ T cells in the pathological process of MS.

This hypothesis of CNS autoimmunity not only supported in the CSF or in the CNS, but also in the blood and in peripheral organs, has already been described for B cells. Indeed, bidirectional migration between the periphery and the CNS have been suggested as clonally related or even identical memory B cells are present both

in the CSF and in the blood.^{2,4} Besides, B cells participating in oligoclonal band production were found in the blood,²⁸ and B cells present in MS lesions were suggested to mature first in the cervical lymph nodes.⁵

Our TCR repertoire results are in line with these data, as T-cell clones found in the CNS lesions could also be found in the CSF and in the blood. TCR repertoire monitoring of blood samples was first proposed to be indicative of the clinical outcome using a rat experimental autoimmune encephalomyelitis model of MS in which T-cell autoreactivity is well defined.²⁹ Numerous studies in humans have shown that MS patients had a bias in their blood TCR repertoire as compared to HV,^{10–12,16,30–32} especially in CD8⁺ T cells.¹² Hence, a correlation was found between the repertoire biases and the disease activity in the blood^{11,16} and in the CSF.¹⁷ Thus, at least part of the expanded clones found in the blood of MS patients is likely to be specific for the disease. Our results clearly show similar TCR expansions between blood CD8 compartment and CNS lesions. Besides, the expanded clones present a phenotype reflecting potential aggressiveness both in blood and in CNS. Indeed, expanded blood CD8⁺ T cells overexpressed CCR5 and CD11a (LFA1), and 60–70% of the lesion-infiltrating CD8⁺ T cells expressed CD11a (LFA1) (CD11a⁺ and CD11a^{high} cannot be differentiated by immunofluorescence). These molecules may be involved in CNS invasion, as suggested by the presence of T cells expressing them in MS lesions, together with their ligands.^{26,27,33,34} In line with this, a decreased immune reconstitution inflammatory syndrome was observed with anti-CCR5 treatment.³⁵ Moreover, progressive multifocal leukoencephalopathy cases and decreased in vitro transmigration of T cells were reported under anti-CD11a treatment (efalizumab).^{36,37} Besides that transmigration-prone phenotype, clonally expanded CD8⁺ T cells from the blood of MS patients were mainly memory cells, with a bias toward CM and TEMRA phenotype. CM cells have been implicated in MS, as the trapping of naïve and CM cells into the lymph nodes with Fingolimod has proven efficacy in relapse prevention.³⁸ Besides, one of the CCR7 ligands, CCL19, has been reported to be expressed in MS lesions,³⁹ or at least on the endothelial cells from the choroid plexus of MS patients.⁴⁰ Although CNS-infiltrating T cells are described to belong to the EM lineage,⁴⁰ CSF CD8⁺ T cells are composed of variable proportions of CM and EM T cells.^{41–43} A loss of CCR7 expression following in situ reactivation or ligand-induced downregulation after infiltration may account for the EM phenotype enrichment in situ. Finally, in our study, 30–60% of clonally expanded CD8⁺ T cells in the blood express GZM-B, suggesting a cytotoxic potential. Some CD8⁺ T cells from the CNS lesions also expressed GZM-B, as previously reported.⁴² Altogether, these data suggest

that blood clonally expanded CD8⁺ T cells are able to invade the CNS and to exert cytotoxic functions, strengthening the implication of CD8⁺ T cells in MS pathophysiology.

To our knowledge, no study has compared CSF and CNS repertoires at the same time. Previous reports showed less repertoire diversity in the CSF than in the blood.^{13,15,44} We show that a large majority of CSF expanded clones are also expanded in the CNS. Consequently, these CSF clones may be very relevant to studying the infiltrating T cells. This is in accordance with a recent analysis of the TCR repertoire in paired blood and CSF samples of MS patients by high-throughput sequencing.⁴⁵ Epstein–Barr virus-specific TCR sequences were enriched in the CSF CD8 subpopulation, supporting the importance of these cells in the pathophysiology of the disease. Deciphering the antigen specificity of the blood and/or CSF expanded CD8⁺ T cells would definitely give further insight into the exact implication of these cells in MS.

Besides giving more insight into the TCR repertoire dynamics in the periphery and in the CNS in MS, our results also enlarge the characterization of lesion-infiltrating T cells. Indeed, we report that some V β clones are shared between different lesions, including NAWM, most of them being CD8⁺ T cells. This is consistent with three studies published so far, including our own.^{6,8,9} These results suggest a dominant antigen, at least in a given patient. Our results also correlate with several studies showing that CD8⁺ T cells outnumbered CD4⁺ T cells in the CNS lesions of MS patients.^{6–8,13,46,47} Altogether, this further enhances the implication of CD8⁺ T cells in MS. The vast majority of infiltrating T cells in the CNS lesions is clonally expanded, questioning their antigen specificity. Our results are of particular interest for groups aiming at characterizing the antigen specificity of these clones.^{19,48–50} Indeed, the cells of interest are obviously more easily accessible by a simple venous puncture than by studying the lesion infiltrating T cells. This would definitely prove whether cells overrepresented in the CNS lesions of MS patients recognize antigens specific for the CNS.

In conclusion, our work provides new insight on the implication and recruitment of circulating clonally expanded CD8⁺ T cells to the CNS lesions of MS patients. These results may have a strong implication as they give more credit to the study of peripherally expanded blood CD8⁺ T cells in this disease, and should allow an easier study of the TCR of implicated clones.

Acknowledgments

The authors thank the patients for their participation in this study, in particular the patients and their families

who accepted to donate their CNS for a better knowledge of this disease. We are also most grateful to the Biogenouest Genomics core facility and to David Hamm, Julie Gi, and Erika Lindsley from Adaptive Biotech for their technical support. The authors also thank S. Pettré and A. Elong-Ngono who helped for the autopsies and M. Jacq-Foucher, F. Le frère, N. Jousset, and S. Wiertelwski who helped for the patients' selection.

Author Contributions

M. S., A. G. and L. M. performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. A. G. S. and D. L. performed some experiments. B. N., F. G., P. H., S. N., D. B., G. R., and J. P. S. performed some experiments or helped writing the manuscript. S. B. and A. N. helped writing the manuscript. N. D. and D. A. L. were responsible for study conception, analyzing the data and writing the manuscript. D. A. L. was funded by ARSEP foundation and the Région Pays-de-Loire to perform this work.

Conflict of Interest

Dr. Salou reports personal fees from Novartis, outside the submitted work. Dr. Michel reports personal fees from Novartis, outside the submitted work. Dr. Guillot reports personal fees from Novartis, outside the submitted work. Dr. LAPLAUD reports grants from Fondation ARSEP, Region Pays de Loire, during the conduct of the study; grants and personal fees from BIOGEN-IDEC, grants and personal fees from NOVARTIS, GENZYME, TEVA, outside the submitted work.

References

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372:1502–1517.
2. Von Büdingen H-C, Kuo TC, Sirota M, et al. B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2012;122:4533–4543.
3. Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, et al. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain* 2011;134(Pt 2):534–541.
4. Palanichamy A, Apeltsin L, Kuo TC, et al. Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 2014;6:248ra106.
5. Stern JNH, Yaari G, Vander Heiden JA, et al. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med* 2014;6:248ra107.
6. Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8⁺ T cells dominate the T cell infiltrate in active

- multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000;192:393–404.
7. Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, et al. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2428–2433.
 8. Junker A, Ivanidze J, Malotka J, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 2007;130:2789–2799.
 9. Montes M, Zhang X, Berthelot L, et al. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin Immunol* 2009;130:133–144.
 10. Matsumoto Y, Yoon WK, Jee Y, et al. Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J Immunol* 2003;170:4846–4853.
 11. Muraro PA, Bonanni L, Mazzanti B, et al. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. *J Neuroimmunol* 2002;127:149–159.
 12. Laplaud D-A, Ruiz C, Wiertlewski S, et al. Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain* 2004;127(Pt 5):981–995.
 13. Démoulin T, Mouthon F, Clayette P, et al. The same TCR (N)Dbeta(N)beta junctional region is associated with several different vbeta13 subtypes in a multiple sclerosis patient at the onset of the disease. *Neurobiol Dis* 2003;14:470–482.
 14. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002;125(Pt 3):538–550.
 15. Lozeron P, Chabas D, Duprey B, et al. T cell receptor V beta 5 and V beta 17 clonal diversity in cerebrospinal fluid and peripheral blood lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 1998;4:154–161.
 16. Laplaud D-A, Berthelot L, Miqueu P, et al. Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. *J Neuroimmunol* 2006;177:151–160.
 17. Muraro PA, Cassiani-Ingoni R, Chung K, et al. Clonotypic analysis of cerebrospinal fluid T cells during disease exacerbation and remission in a patient with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006;171:177–183.
 18. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 2005;58:840–846.
 19. Seitz S, Schneider CK, Malotka J, et al. Reconstitution of paired T cell receptor alpha- and beta-chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12057–12062.
 20. Monteiro J, Hingorani R, Choi IH, et al. Oligoclonality in the human CD8⁺ T cell repertoire in normal subjects and monozygotic twins: implications for studies of infectious and autoimmune diseases. *Mol Med* 1995;1:614–624.
 21. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995;42:455–500.
 22. Puisieux I, Even J, Pannetier C, et al. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J Immunol* 1994;153:2807–2818.
 23. Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood* 2009;114:4099–4107.
 24. Carlson CS, Emerson RO, Sherwood AM, et al. Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. *Nat Commun* 2013;4:2680.
 25. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008;73:975–983.
 26. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 2012;33:579–589.
 27. Hamann I, Zipp F, Infante-Duarte C. Therapeutic targeting of chemokine signaling in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2008;274:31–38.
 28. Bankoti J, Apeltsin L, Hauser SL, et al. In multiple sclerosis, oligoclonal bands connect to peripheral B-cell responses. *Ann Neurol* 2014;75:266–276.
 29. Kim G, Kohyama K, Tanuma N, Matsumoto Y. Diagnosis and assessment of preclinical and clinical autoimmune encephalomyelitis using peripheral blood lymphocyte TCR. *Eur J Immunol* 1998;28:2751–2759.
 30. Gran B, Gestri D, Sottini A, et al. Detection of skewed T-cell receptor V-beta gene usage in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1998;85:22–32.
 31. Musette P, Bequet D, Delarbre C, et al. Expansion of a recurrent V beta 5.3⁺ T-cell population in newly diagnosed and untreated HLA-DR2 multiple sclerosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12461–12466.
 32. Warnke C, Mausberg AK, Stettner M, et al. Natalizumab affects the T-cell receptor repertoire in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2013;81:1400–1408.
 33. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5⁺ and CXCR3⁺ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6873–6878.
 34. Bö L, Peterson JW, Mørk S, et al. Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:1060–1072.

35. Giacomini PS, Rozenberg A, Metz I, et al. Maraviroc and JC virus-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *N Engl J Med* 2014;370:486–488.
36. Kothary N, Diak I-L, Brinker A, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with efalizumab use in psoriasis patients. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:546–551.
37. Schwab N, Ulzheimer JC, Fox RJ, et al. Fatal PML associated with efalizumab therapy: insights into integrin $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ in JC virus control. *Neurology* 2012;78:458–467; discussion 465.
38. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:883–897.
39. Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F, et al. CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 2007;190:72–79.
40. Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, et al. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol* 2004;55:627–638.
41. Giunti D, Borsellino G, Benelli R, et al. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol* 2003;73:584–590.
42. Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI, et al. Central nervous system recruitment of effector memory CD8 + T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on α4 integrin. *Brain* 2011;134(Pt 12):3560–3577.
43. Jilek S, Schlupe M, Rossetti AO, et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8 + T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2007;123:105–113.
44. Gestri D, Baldacci L, Taiuti R, et al. Oligoclonal T cell repertoire in cerebrospinal fluid of patients with inflammatory diseases of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:767–772.
45. Lossius A, Johansen JN, Vartdal F, et al. High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 2014;44:3439–3452.
46. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1983;62:219–232.
47. Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, et al. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1986;19:578–587.
48. Dornmair K, Meinel E, Hohlfeld R. Novel approaches for identifying target antigens of autoreactive human B and T cells. *Semin Immunopathol* 2009;31:467–477.
49. Kim S-M, Bhonsle L, Besgen P, et al. Analysis of the paired TCR α - and β -chains of single human T cells. *PLoS One* 2012;7:e37338.
50. Siewert K, Malotka J, Kawakami N, et al. Unbiased identification of target antigens of CD8 + T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nat Med* 2012;18:824–828.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Characteristic of the antibodies used.

Table S2. Primers used for the CDR3 spectratyping.

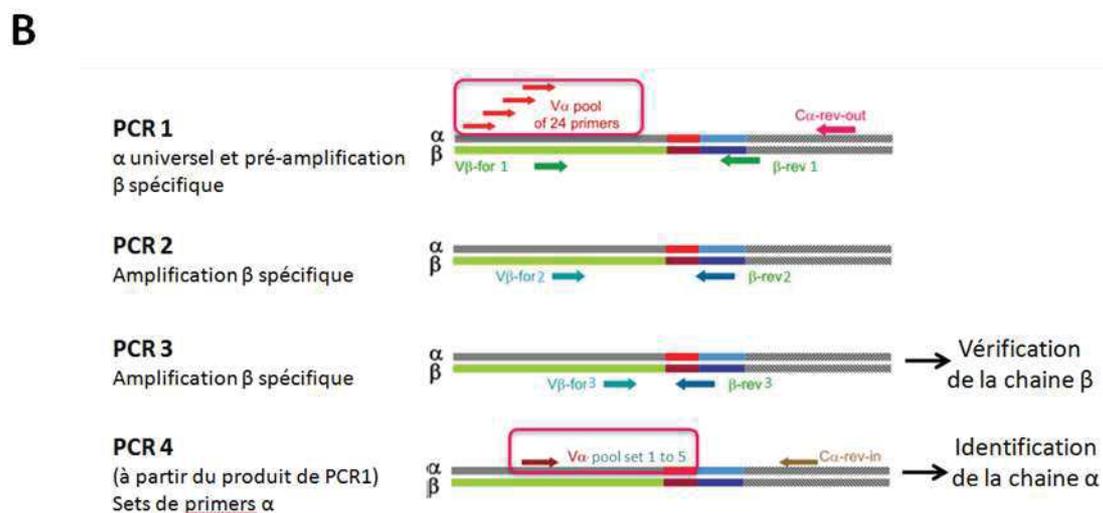
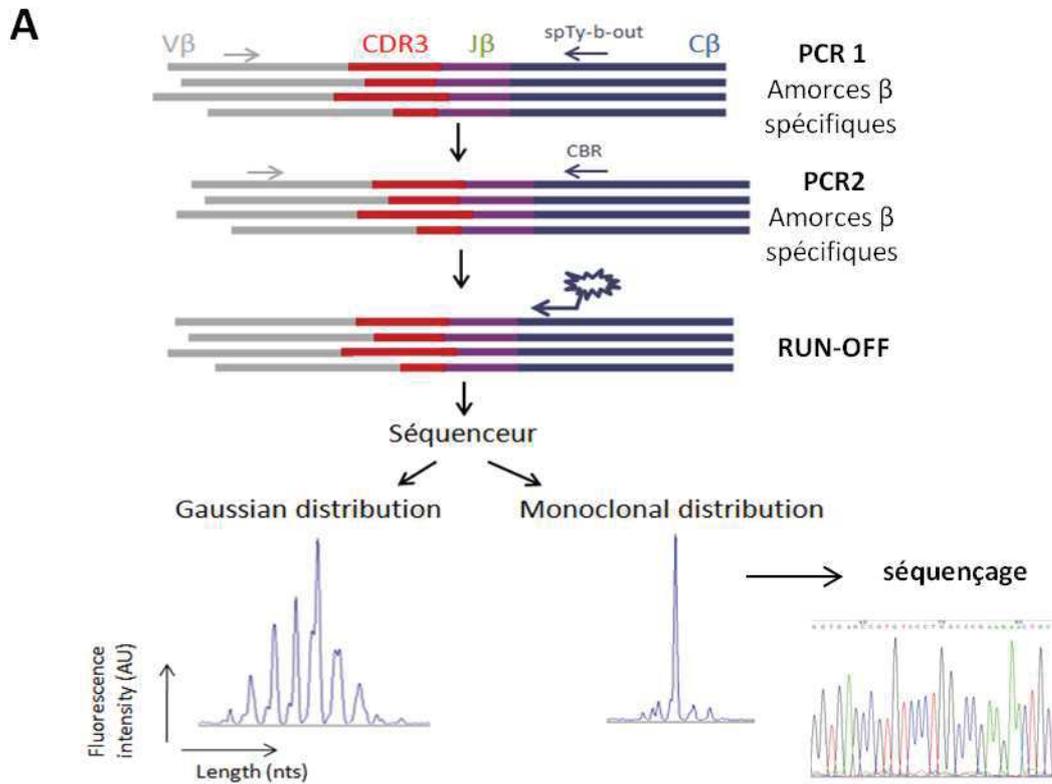
Table S3. Summary of high-throughput sequencing samples.

Table S4. Amino acid sequences of the expanded clones.

Figure S1. Examples of CDR3-LD and CDR3-LD comparisons. (A) Examples of the different CDR3-LD as described in Methods. (B) Examples of correlation, distance and similarity scores obtained for the comparison of the presented CDR3-LD.

Figure S2. The repertoire in the periphery does not mirror a particular lesion type. $V\beta$ families with mono/oligoclonal CDR3-LD from the blood and the CSF were compared to the corresponding families in the CNS (correlation coefficients and distance scores), as described in Figure 2. The lesions were separated according to their classification as active ($n = 9$), chronic active ($n = 5$), meningeal ($n = 3$), and NAWM ($n = 5$).

Annexe 2 : Illustration du protocole de CDR3 spectratyping et d'amplification par PCR unicellulaire des chaînes β et α . **A.** La région CDR3 est amplifiée au cours de 2 PCR successives (PCR1 et PCR2), suivies d'une PCR de run-off qui permet de marquer les amplicons afin de visualiser la distribution des différentes longueurs de CDR3 pour chaque famille V β . **B.** La PCR1, PCR2 et PCR3 permettent d'amplifier et de vérifier la chaîne β . La PCR4 effectuée à partir de la PCR1 permet d'amplifier puis caractériser par séquençage la chaîne α .



Annexe 3 : Liste des amorces. Amorces pour la transcription inverse de l'ARNm en ADNc. Amorces sens et anti-sens pour l'amplification des chaînes β et α .

		Nom (Classification Arden)	5'-3'
Amorce pour la transcription inverse		poly-dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Amorces pour identification chaîne β (PCR repertoire)	PCR I antisens	SpTy-b-out	ACACCAGTGTGGCCTTTTGG
	PCR II antisens	CbR	CTTCTGATGGCTCAAACAC
	PCR I et II sens	BV1	CAACAGTTCCTGACTTGAC
		BV2	TCAACCATGCAAGCCTGACCT
		BV3	TCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC
		BV4	CATATGAGAGTGGATTTGCATT
		BV5.1	TTCACTGAGACACAGAGAAAC
		BV5.2	CCTAACTATAGCTCTGAGCTG
		BV6	AGGCCTGAGGGATCCGTCTC
		BV7	CTGAATGCCCAACAGCTCTC
		BV8	TACTTTAAACAACAACGTTCCG
		BV9	AAATCTCCAGACAAAGCTCAC
		BV11	ACAGTCTCCAGAATAAGGACG
		BV12	GACAAGGAGAAGTCTCAGAT
		BV13.1	GACCAAGGAGAAGTCCCAAT
		BV13.2	GTTGGTGAGGTACAACGCC
		BV14	TCTCGAAAAGAGAAGGAAT
		BV15	GTCTCTCGACAGGCACAGGCT
		BV16	GAGTCTAAACAGGATGAGTCC
		BV17	CACAGATAGTAAATGACTTTTCCAG
		BV18	GAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
		BV20	TCTGAGGTGCCCCAGAATCTC
		BV21	GATATGAGAATGAGGAAGCAG
		BV22	CAGAGAAGTCTGAAATATTCTGA
BV23	TCATTTCTGTTTTATGAAAAGATGC		
BV24	AAAGATTTTAAACATGAAGCAGAC		
Amorces pour la transcription inverse		Cb-RT	GAAGAAGCCTGTGGCC
		Ca RT	GCCACAGCACTGTTGC
Amorces pour identification chaîne α (PCR unicellulaire)	PCR 4 antisens	Ca Rev out	GCAGACAGACTTGTCTACTGG
	PCR 4 sens	Va-114for-out	AGSAGCCTCACTGGAGTTG
		Va-1235for-out	CTGAGGTGCAACTACTCATC
		Va-2 for-out	CARTGTTCCAGAGGGAGCC
		Va-3,25 for-out	GAARATGYCWCCATGAACTGC
		Va-4,20 for-out	WTGCTAAGACCACCCAGCC
		Va-5 for-out	AGATAGAACAGAATCCGAGG
		Va-6,14-for-out	RYTGACACATATGACACCAGTG
		Va-7-for-out	CACGTACCAGACATCTGGG
		Va-8,21-for-out	CCTGAGYGTCCAGGARGG
		Va-9-for-out	GTGCAACTATTCTATTCTGG
		Va-10,24-for-out	ASTGGAGCAGAGYCCTCAG
		Va-11-for-out	TCTTCAGAGGGAGCTGTGG
		Va-12-for-out	GGTGGAGAAGGAGGATGTG
		Va-13,19,26-for-out	SAASTGGAGCAGAGTCCTC
		Va-15-for-out	CCTGAGTGTCCGAGAGGG
		Va-16-for-out	ATGCACCTATTCTAGTCTCTGG
		Va-17-for-out	TGATAGTCCAGAAGGAGGG
		Va-18-for-out	GTCACTGCATGTTCTAGGAGG
		Va-22,31-for-out	CCCTWCCCTTTCTGGTATG
Va-23,30-for-out	GGCARGAYCCTGGGAAAGG		
Va-27-for-out	CTGTTCTGAGCATGCAGG		
Va-28-for-out	AGACAAGGTGGTACAAAGCC		
Va-29-for-out	CAACCAGTGCAGAGTCCTC		
Va-32-for-out	GCATGTACAAGAAGGAGAGG		

Annexe 4 : Séquence signal. Ce peptide d'adressage est situé à l'extrémité N' terminale de la protéine et codé par des codons situés en amont de l'ARNm de la protéine. Utilisation du logiciel SignalP4.1 Server pour prédire le site de clivage des peptides signaux et le cas échéant remplacement par un autre peptide signal.

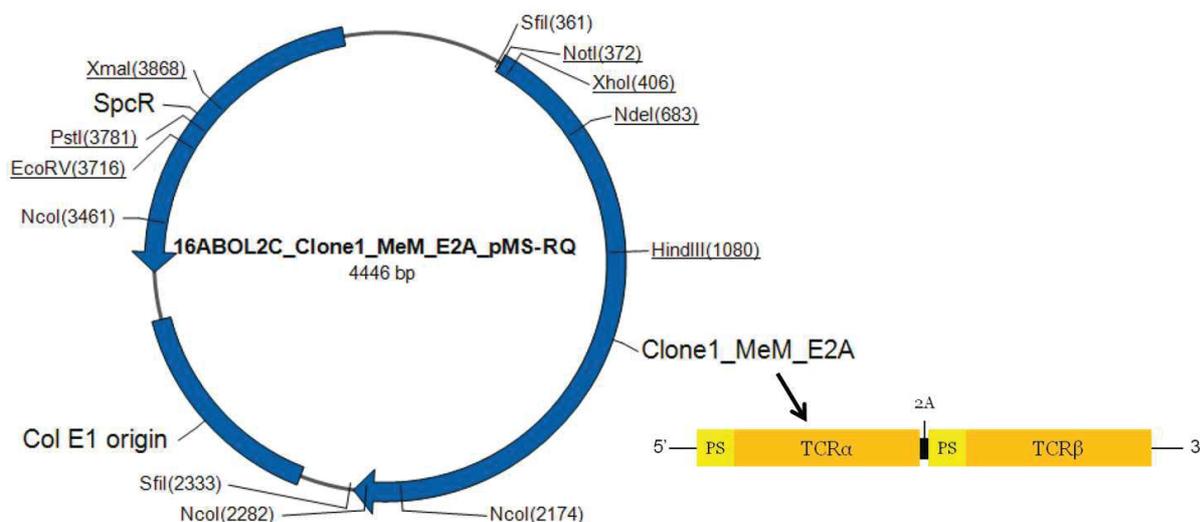
		Séquence signal d'origine		Remplacement séquence signal
Clone 1	TRAV8-2	MLLLPVLEVIFTLGGTRA*QSVTQLDSH		-
	TRBV6-2	MSLGLCCGAFSLLWAGPVNA*GVTQTPKF		-
Clone 4	TRAV8-2	MLLLPVLEVIFTLGGTRA*QSVTQLDSH		-
	TRBV6-2	MSLGLCCGAFSLLWAGPVNA*GVTQTPKF		-
Clone 5	TRAV8-2	MLLLPVLEVIFTLGGTRAQ*SVTQLDSH		-
	TRBV5-1	MGSRLCWVLLCCLGAGPVKA*GVTQTPRY		-
Clone 6	TRAV8-3	MLELIPLLGIHFVLRARA*QSVTPDIH		-
	TRBV25-1	MTIRLLCYVGFYFLGAGLMEADYQTPRYL	TRBV6-2	MSLGLCCGAFSLLWAGPVEA*DIYQTP
Clone 7	TRAV1-2	MWGVFLLYVSMKMGTTG*QNIDQPTMTA		-
	TRBV25-1	MTIRLLCYVGFYFLGAGLMEADYQTPRYL	TRBV6-2	MSLGLCCGAFSLLWAGPVEA*DIYQTP
Clone 8	TRAV12-2	MKSLRVLLVILWLQLSWVWS*QKQVEQNS		-
	TRBV6-2	MSLGLCCGAFSLLWAGPVNAG*VTQTPKF		-
Clone 9	TRAV12-2	MKSLRVLLVILWLQLSWVWS*QKQVEQNS		-
	TRBV5-5	MGPGLCWVLLCCLGAGPVDA*GVTQSPTH		-

* = prédiction du site de clivage
peptide signal début chaîne α ou β

SignalP 4.1 Server

Predicts the presence and location of signal peptide cleavage sites in amino acid sequences. The method incorporates a prediction of cleavage sites and a signal peptide/non-signal peptide prediction based on a combination of several artificial neural networks.
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Annexe 5 : Schéma de la séquence intégrée au vecteur d'expression pRc/RSV. PS (peptide signal) : adressage à la membrane. 2A: peptide (21 aa) auto-clivable pour production équimolaire des gènes en amont et en aval.



BIBLIOGRAPHIE

X. Bibliographie

Ajibade, A.A., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2013). Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends Immunol.* *34*, 307–316.

Annibaldi, V., Ristori, G., Angelini, D.F., Serafini, B., Mechelli, R., Cannoni, S., Romano, S., Paolillo, A., Abderrahim, H., Diamantini, A., et al. (2011). CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* *134*, 542–554.

Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., and Mak, T.W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* *42*, 455–500.

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

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

Becher, B., Spath, S., and Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 49–59.

Berthelot, L., Laplaud, D.-A., Pettré, S., Ballet, C., Michel, L., Hillion, S., Braudeau, C., Connan, F., Lefrère, F., Wiertlewski, S., et al. (2008). Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1889–1899.

Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., and Brück, W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain J. Neurol.* *123 (Pt 6)*, 1174–1183.

Booss, J., Esiri, M.M., Tourtellotte, W.W., and Mason, D.Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *62*, 219–232.

Boucher, A., Desforgues, M., Duquette, P., and Talbot, P.J. (2007). Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *123*, 258–267.

Brickshawana, A., Hinson, S.R., Romero, M.F., Lucchinetti, C.F., Guo, Y., Buttmann, M., McKeon, A., Pittock, S.J., Chang, M.-H., Chen, A.-P., et al. (2014). Investigation of the KIR4.1 potassium channel as a putative antigen in patients with multiple sclerosis: a comparative study. *Lancet Neurol.* *13*, 795–806.

Compston, A., and Coles, A. (2008a). Multiple sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* *372*, 1502–1517.

Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., and Adeleine, P. (2000). Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1430–1438.

- Corthay, A., Nandakumar, K.S., and Holmdahl, R. (2001). Evaluation of the percentage of peripheral T cells with two different T cell receptor alpha-chains and of their potential role in autoimmunity. *J. Autoimmun.* *16*, 423–429.
- Crawford, M.P., Yan, S.X., Ortega, S.B., Mehta, R.S., Hewitt, R.E., Price, D.A., Stastny, P., Douek, D.C., Koup, R.A., Racke, M.K., et al. (2004). High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* *103*, 4222–4231.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* *334*, 395–402.
- Davodeau, F., Peyrat, M.A., Romagné, F., Necker, A., Hallet, M.M., Vié, H., and Bonneville, M. (1995). Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *181*, 1391–1398.
- De Jager, P.L., Baecher-Allan, C., Maier, L.M., Arthur, A.T., Ottoboni, L., Barcellos, L., McCauley, J.L., Sawcer, S., Goris, A., Saarela, J., et al. (2009). The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 5264–5269.
- Degauque, N., Brouard, S., and Soulillou, J.-P. (2016). Cross-Reactivity of TCR Repertoire: Current Concepts, Challenges, and Implication for Allotransplantation. *Front. Immunol.* *7*, 89.
- Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P., Ferrero, B., Eid, P., and Novelli, F. (2009). T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.* *65*, 499–509.
- Elong Ngonu, A., Pettré, S., Salou, M., Bahbouhi, B., Soulillou, J.-P., Brouard, S., and Laplaud, D.-A. (2012). Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *144*, 117–126.
- Farez, M.F., Fiol, M.P., Gaitán, M.I., Quintana, F.J., and Correale, J. (2015). Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *86*, 26–31.
- Franceschini, D., Del Porto, P., Piconese, S., Trella, E., Accapezzato, D., Paroli, M., Morrone, S., Piccolella, E., Spada, E., Mele, A., et al. (2012). Polyfunctional type-1, -2, and -17 CD8⁺ T cell responses to apoptotic self-antigens correlate with the chronic evolution of hepatitis C virus infection. *PLoS Pathog.* *8*, e1002759.
- Fromont, A., Biquet, C., Sauleau, E.A., Fournel, I., Bellisario, A., Adnet, J., Weill, A., Vukusic, S., Confavreux, C., Debouverie, M., et al. (2010). Geographic variations of multiple sclerosis in France. *Brain J. Neurol.* *133*, 1889–1899.
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Müller, P.F., Wolf, Y., Varol, D., Yona, S., Brendecke, S.M., Kierdorf, K., Staszewski, O., Datta, M., et al. (2013). A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat. Neurosci.* *16*, 1618–1626.
- Gourraud, P.-A., Harbo, H.F., Hauser, S.L., and Baranzini, S.E. (2012). The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol. Rev.* *248*, 87–103.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 393–407.

- Gran, B., Gestri, D., Sottini, A., Quiròs Roldàn, E., Bettinardi, A., Signorini, S., Primi, D., Ballerini, C., Taiuti, R., Amaducci, L., et al. (1998). Detection of skewed T-cell receptor V-beta gene usage in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *85*, 22–32.
- Green, D.R., Droin, N., and Pinkoski, M. (2003). Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* *193*, 70–81.
- Harp, C.T., Lovett-Racke, A.E., Racke, M.K., Frohman, E.M., and Monson, N.L. (2008). Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *128*, 382–391.
- Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C., and Weiner, H.L. (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* *19*, 578–587.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *358*, 676–688.
- Havrdová, E., Belova, A., Goloborodko, A., Tisserant, A., Wright, A., Wallstroem, E., Garren, H., Maguire, R.P., and Johns, D.R. (2016). Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J. Neurol.*
- Hedström, A.K., Olsson, T., and Alfredsson, L. (2015). Smoking is a major preventable risk factor for multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*
- Höftberger, R., Aboul-Enein, F., Brueck, W., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Schmidbauer, M., Jellinger, K., and Lassmann, H. (2004). Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *14*, 43–50.
- Hooijberg, E., Bakker, A.Q., Ruizendaal, J.J., and Spits, H. (2000). NFAT-controlled expression of GFP permits visualization and isolation of antigen-stimulated primary human T cells. *Blood* *96*, 459–466.
- Ifergan, I., Kebir, H., Alvarez, J.I., Marceau, G., Bernard, M., Bourbonnière, L., Poirier, J., Duquette, P., Talbot, P.J., Arbour, N., et al. (2011a). Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin. *Brain J. Neurol.* *134*, 3560–3577.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I.W., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., et al. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* *357*, 851–862.
- Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2002). Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain J. Neurol.* *125*, 538–550.
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2007). Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain J. Neurol.* *130*, 2789–2799.

- Jurewicz, A., Biddison, W.E., and Antel, J.P. (1998). MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *160*, 3056–3059.
- Kappos, L., Radue, E.-W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., et al. (2010). A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *362*, 387–401.
- Karttunen, J., Sanderson, S., and Shastri, N. (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6020–6024.
- Kekäläinen, E., Hänninen, A., Maksimow, M., and Arstila, T.P. (2010). T cells expressing two different T cell receptors form a heterogeneous population containing autoreactive clones. *Mol. Immunol.* *48*, 211–218.
- Kim, J.H., Lee, S.-R., Li, L.-H., Park, H.-J., Park, J.-H., Lee, K.Y., Kim, M.-K., Shin, B.A., and Choi, S.-Y. (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* *6*, e18556.
- Klein, L., Klugmann, M., Nave, K.A., Tuohy, V.K., and Kyewski, B. (2000). Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* *6*, 56–61.
- Kurtzke, J.F. (1975). A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* *51*, 137–157.
- Laplaud, D.-A., and Confavreux, C. (2006). [Etiology of multiple sclerosis]. *Rev. Prat.* *56*, 1306–1312.
- Laplaud, D.-A., Ruiz, C., Wiertlewski, S., Brouard, S., Berthelot, L., Guillet, M., Melchior, B., Degauque, N., Edan, G., Brachet, P., et al. (2004). Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain J. Neurol.* *127*, 981–995.
- Laplaud, D.-A., Berthelot, L., Miqueu, P., Bourcier, K., Moynard, J., Oudinet, Y., Guillet, M., Ruiz, C., Oden, N., Brouard, S., et al. (2006). Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. *J. Neuroimmunol.* *177*, 151–160.
- Larochelle, C., Lécuyer, M.-A., Alvarez, J.I., Charabati, M., Saint-Laurent, O., Ghannam, S., Kebir, H., Flanagan, K., Yednock, T., Duquette, P., et al. (2015). Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. *Ann. Neurol.* *78*, 39–53.
- Lassmann, H. (2007). Experimental models of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)* *163*, 651–655.
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* *37*, D1006-1012.
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., and Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)* *172*, 3–13.

- Libbey, J.E., Cusick, M.F., and Fujinami, R.S. (2014). Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int. Rev. Immunol.* *33*, 266–283.
- Lindsey, J.W., and Hatfield, L.M. (2010). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: cellular immune response and cross-reactivity. *J. Neuroimmunol.* *229*, 238–242.
- Lolli, F., Martini, H., Citro, A., Franceschini, D., Portaccio, E., Amato, M.P., Mechelli, R., Annibaldi, V., Sidney, J., Sette, A., et al. (2013). Increased CD8+ T cell responses to apoptotic T cell-associated antigens in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* *10*, 94.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., et al. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* *523*, 337–341.
- Lovett-Racke, A.E., Yang, Y., and Racke, M.K. (2011). Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 246–251.
- Lozeron, P., Chabas, D., Duprey, B., Lyon-Caen, O., and Liblau, R. (1998). T cell receptor V beta 5 and V beta 17 clonal diversity in cerebrospinal fluid and peripheral blood lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *4*, 154–161.
- Malmeström, C., Lycke, J., Haghighi, S., Andersen, O., Carlsson, L., Wadenvik, H., and Olsson, B. (2008). Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *J. Neuroimmunol.* *196*, 159–165.
- Martinelli Boneschi, F., Vacchi, L., Rovaris, M., Capra, R., and Comi, G. (2013). Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002127.
- Matsumoto, Y., Yoon, W.K., Jee, Y., Fujihara, K., Misu, T., Sato, S., Nakashima, I., and Itoyama, Y. (2003). Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4846–4853.
- Medana, I., Martinic, M.A., Wekerle, H., and Neumann, H. (2001). Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am. J. Pathol.* *159*, 809–815.
- Mehling, M., Lindberg, R., Raulf, F., Kuhle, J., Hess, C., Kappos, L., and Brinkmann, V. (2010). Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* *75*, 403–410.
- Meier, U.-C., Giovannoni, G., Tzartos, J.S., and Khan, G. (2012). Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. B cells in multiple sclerosis: drivers of disease pathogenesis and Trojan horse for Epstein-Barr virus entry to the central nervous system? *Clin. Exp. Immunol.* *167*, 1–6.
- Melcon, M.O., Correale, J., and Melcon, C.M. (2014). Is it time for a new global classification of multiple sclerosis? *J. Neurol. Sci.* *344*, 171–181.
- Miller, D.H., Khan, O.A., Sheremata, W.A., Blumhardt, L.D., Rice, G.P.A., Libonati, M.A., Willmer-Hulme, A.J., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., O'Connor, P.W., et al. (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *348*, 15–23.

- Miyazaki, Y., Miyake, S., Chiba, A., Lantz, O., and Yamamura, T. (2011). Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.* *23*, 529–535.
- Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M.S., Patarroyo, J.C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A.J., Hidalgo, J., et al. (2013). MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J. Exp. Med.* *210*, 2921–2937.
- Monteiro, J., Hingorani, R., Peroglizzi, R., Apatoff, B., and Gregersen, P.K. (1996). Oligoclonality of CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* *23*, 127–138.
- Montes, M., Zhang, X., Berthelot, L., Laplaud, D.-A., Brouard, S., Jin, J., Rogan, S., Armao, D., Jewells, V., Soullou, J.-P., et al. (2009). Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *130*, 133–144.
- Mulvey, M.R., Doupe, M., Prout, M., Leong, C., Hizon, R., Grossberndt, A., Klowak, M., Gupta, A., Melanson, M., Gomori, A., et al. (2011). Staphylococcus aureus harbouring Enterotoxin A as a possible risk factor for multiple sclerosis exacerbations. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *17*, 397–403.
- Munger, K.L., Bentzen, J., Laursen, B., Stenager, E., Koch-Henriksen, N., Sørensen, T.I.A., and Baker, J.L. (2013). Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *19*, 1323–1329.
- Muraro, P.A., Bonanni, L., Mazzanti, B., Pantalone, A., Traggi, E., Massacesi, L., Vergelli, M., and Gambi, D. (2002). Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. *J. Neuroimmunol.* *127*, 149–159.
- Nerrant, E., Salsac, C., Charif, M., Ayrignac, X., Carra-Dalliere, C., Castelnovo, G., Goulabchand, R., Tisseyre, J., Raoul, C., Eliaou, J.-F., et al. (2014). Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *20*, 1699–1703.
- Nicol, B. (2016) p4. Implication des lymphocytes TCD8+ exprimant l'antigène CD161 dans la physiopathologie de la sclérose en plaques. Thèse de Doctorat Universitaire de Nantes.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K., and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 123–132.
- Nylander, A., and Hafler, D.A. (2012). Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *122*, 1180–1188.
- Oksenberg, J.R., and Baranzini, S.E. (2010). Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? *Nat. Rev. Neurol.* *6*, 429–437.
- Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., and Johnson, K.P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* *1*, 893–895.
- Phetsouphanh, C., Zaunders, J.J., and Kelleher, A.D. (2015). Detecting Antigen-Specific T Cell Responses: From Bulk Populations to Single Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 18878–18893.

- Pierrot-Deseilligny, C., and Souberbielle, J.-C. (2010). Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain J. Neurol.* *133*, 1869–1888.
- Pierson, E.R., Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2014). B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 929–939.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.-P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., et al. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann. Neurol.* *58*, 840–846.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., et al. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* *69*, 292–302.
- Puisieux, I., Even, J., Pannetier, C., Jotereau, F., Favrot, M., and Kourilsky, P. (1994). Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *153*, 2807–2818.
- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 707–747.
- Rawson, P.M., Molette, C., Videtta, M., Altieri, L., Franceschini, D., Donato, T., Finocchi, L., Propato, A., Paroli, M., Meloni, F., et al. (2007). Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nat. Med.* *13*, 1431–1439.
- Rivers, T.M., Sprunt, D.H., and Berry, G.P. (1933). OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J. Exp. Med.* *58*, 39–53.
- Salou, M., Elong Ngonu, A., Garcia, A., Michel, L., and Laplaud, D.-A. (2013). [Adaptative immunity and pathophysiology of multiple sclerosis]. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Française Médecine Interne* *34*, 479–486.
- Salou, M., (2014) p19. Implication des lymphocytes T CD8⁺ à répertoire restreint dans la sclérose en plaques. Thèse de Doctorat universitaire de Nantes.
- Salou, M., Garcia, A., Michel, L., Gainche-Salmon, A., Loussouarn, D., Nicol, B., Guillot, F., Hulin, P., Nedellec, S., Baron, D., et al. (2015). Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *2*, 609–622.
- Salou, M., Nicol, B., Garcia, A., Baron, D., Michel, L., Elong-Ngonu, A., Hulin, P., Nedellec, S., Jacq-Foucher, M., Le Frère, F., et al. (2016). Neuropathologic, phenotypic and functional analyses of Mucosal Associated Invariant T cells in Multiple Sclerosis. *Clin. Immunol. Orlando Fla.*
- Sauer, B.M., Schmalstieg, W.F., and Howe, C.L. (2013). Axons are injured by antigen-specific CD8(+) T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism. *Neurobiol. Dis.* *59*, 194–205.
- Sawcer, S., Franklin, R.J.M., and Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* *13*, 700–709.

Schubert, D.A., Gordo, S., Sabatino, J.J., Vardhana, S., Gagnon, E., Sethi, D.K., Seth, N.P., Choudhuri, K., Reijonen, H., Nepom, G.T., et al. (2012). Self-reactive human CD4 T cell clones form unusual immunological synapses. *J. Exp. Med.* *209*, 335–352.

Sewell, A.K. (2012). Why must T cells be cross-reactive? *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 669–677.

Siewert, K., Malotka, J., Kawakami, N., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2012). Unbiased identification of target antigens of CD8+ T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nat. Med.* *18*, 824–828.

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

Soilu-Hänninen, M., Laaksonen, M., Laitinen, I., Erälä, J.-P., Lilius, E.-M., and Mononen, I. (2008). A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *79*, 152–157.

Soos, J.M., Mujtaba, M.G., Schiffenbauer, J., Torres, B.A., and Johnson, H.M. (2002). Intramolecular epitope spreading induced by staphylococcal enterotoxin superantigen reactivation of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *123*, 30–34.

Srivastava, R., Aslam, M., Kalluri, S.R., Schirmer, L., Buck, D., Tackenberg, B., Rothhammer, V., Chan, A., Gold, R., Berthele, A., et al. (2012). Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *367*, 115–123.

Stockinger, B., Veldhoen, M., and Martin, B. (2007). Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* *19*, 353–361.

Tilloy, F., Treiner, E., Park, S.H., Garcia, C., Lemonnier, F., de la Salle, H., Bendelac, A., Bonneville, M., and Lantz, O. (1999). An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.* *189*, 1907–1921.

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

Wang, H.H., Dai, Y.Q., Qiu, W., Lu, Z.Q., Peng, F.H., Wang, Y.G., Bao, J., Li, Y., and Hu, X.Q. (2011). Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* *18*, 1313–1317.

Windhagen, A., Newcombe, J., Dangond, F., Strand, C., Woodroffe, M.N., Cuzner, M.L., and Hafler, D.A. (1995). Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* *182*, 1985–1996.

Wucherpfennig, K.W., and Sethi, D. (2011). T cell receptor recognition of self and foreign antigens in the induction of autoimmunity. *Semin. Immunol.* *23*, 84–91.

Yin, Y., Li, Y., and Mariuzza, R.A. (2012). Structural basis for self-recognition by autoimmune T-cell receptors. *Immunol. Rev.* *250*, 32–48.

Zandian, A., Forsström, B., Häggmark-Månberg, A., Schwenk, J.M., Uhlén, M., Nilsson, P., and Ayoglu, B. (2017). Whole-Proteome Peptide Microarrays for Profiling Autoantibody Repertoires within Multiple Sclerosis and Narcolepsy. *J. Proteome Res.* *16*, 1300–1314.

Zang, Y.C.Q., Li, S., Rivera, V.M., Hong, J., Robinson, R.R., Breitbach, W.T., Killian, J., and Zhang, J.Z. (2004). Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 5120–5127.

RESUME ET MOTS CLES

XI. Résumé et mots clés

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie autoimmune démyélinisante du système nerveux central (SNC), dans laquelle les lymphocytes T (LT) CD4⁺ ont longtemps été décrits comme jouant le rôle pathologique principal. L'implication des LT CD8⁺ a été mise en évidence plus récemment, grâce à des arguments génétiques, neuropathologiques et immunologiques. Dans les lésions du SNC des patients SEP, les LT CD8⁺ sont prédominants et ont une répartition oligoclonale, suggérant une infiltration ou une prolifération *in situ* dépendante d'un antigène. Dans nos précédents travaux, l'étude du répertoire T des différents compartiments (SNC, liquide céphalo rachidien (LCR) et sang) a montré l'existence d'une similarité des LT CD8⁺ prédominants. Nous avons mis en place une méthodologie afin d'étudier au niveau unicellulaire, le récepteur des cellules T (TCR) dans le but d'identifier la cible antigénique de ces clones potentiellement impliqués en début de maladie. Après cette caractérisation du TCR nous avons construit un vecteur d'expression contenant la séquence de la chaîne α et β du TCR. Ce vecteur d'expression a été transfecté dans une lignée T d'hybridome de souris 58 α -/ β , afin de lui faire exprimer le TCR humain issu de 8 clones CD8⁺ de patients et de contrôles. En parallèle, nous avons réalisé un clone CD8⁺ contrôle, restreint au HLA-A2 et reconnaissant le peptide 26-35 du Melan-A. Cet hybridome, lorsqu'il possède un TCR fonctionnel, va sécréter de l'IL-2 lorsque le TCR est activé par sa cible antigénique. Une identification a été réalisée afin de savoir si ces clones pouvaient reconnaître des peptides dérivés de la myéline, de peptides dérivés de protéines apoptotiques ou de lysats cellulaires dérivés de lignées neuronales et astrocytaires. A ce jour, aucune des cibles testées n'a pu être mise en cause. Cependant nous avons amélioré un système permettant d'identifier le TCR des LT CD8⁺ du LCR et valider la création de lignées permettant l'étude de la cible antigénique. En effet, nous avons montré que la présentation du peptide Melan-A par une lignée BEBV à notre clone contrôle permettait la sécrétion d'IL-2. La présentation via des cellules dendritiques autologues est encore à mettre au point. L'étude de ces clones CD8⁺ en début de maladie est capitale afin de mieux comprendre les mécanismes qui se mettent en place et l'implication des LT CD8⁺ dans la physiopathologie de la SEP.

MOTS-CLÉS : Sclérose en plaques - Système nerveux central - LCR - Lymphocytes T CD8⁺ - Répertoire T - TCR - Antigène

**Caractérisation des TCR et de la cible antigénique de lymphocytes T
CD8⁺ impliqués dans la sclérose en plaques**

Garcia Alexandra

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune démyélinisante du système nerveux central (SNC), dans laquelle les lymphocytes T (LT) CD4⁺ ont longtemps été décrits comme jouant le rôle pathologique principal. L'implication des LT CD8⁺ a été mise en évidence plus récemment, grâce à des arguments génétiques, neuropathologiques et immunologiques. Dans les lésions du SNC des patients SEP, les LT CD8⁺ sont prédominants et ont une répartition oligoclonale, suggérant une infiltration ou une prolifération *in situ* dépendante d'un antigène. Dans nos précédents travaux, l'étude du répertoire T des différents compartiments (SNC, liquide céphalo rachidien (LCR) et sang) a montré l'existence d'une similarité des LT CD8⁺ prédominants. Nous avons mis en place une méthodologie afin d'étudier au niveau unicellulaire, le récepteur des cellules T (TCR) dans le but d'identifier la cible antigénique de ces clones potentiellement impliqués en début de maladie. Après cette caractérisation du TCR nous avons construit un vecteur d'expression contenant la séquence de la chaîne α et β du TCR. Ce vecteur d'expression a été transfecté dans une lignée T d'hybridome de souris 58 ^{α/β} , afin de lui faire exprimer le TCR humain issu de 8 clones CD8⁺ de patients et de contrôles. En parallèle, nous avons réalisé un clone CD8⁺ contrôle, restreint au HLA-A2 et reconnaissant le peptide 26-35 du Melan-A. Cet hybridome, lorsqu'il possède un TCR fonctionnel, va sécréter de l'IL-2 lorsque le TCR est activé par sa cible antigénique. Une identification a été réalisée afin de savoir si ces clones pouvaient reconnaître des peptides dérivés de la myéline, de peptides dérivés de protéines apoptotiques ou de lysats cellulaires dérivés de lignées neuronales et astrocytaires. A ce jour, aucune des cibles testées n'a pu être mise en cause. Cependant nous avons amélioré un système permettant d'identifier le TCR des LT CD8⁺ du LCR et valider la création de lignées permettant l'étude de la cible antigénique. En effet, nous avons montré que la présentation du peptide Melan-A par une lignée BEBV à notre clone contrôle permettait la sécrétion d'IL-2. La présentation via des cellules dendritiques autologues est encore à mettre au point. L'étude de ces clones CD8⁺ en début de maladie est capitale afin de mieux comprendre les mécanismes qui se mettent en place et l'implication des LT CD8⁺ dans la physiopathologie de la SEP.

MOTS-CLÉS : Sclérose en plaques - Système nerveux central - LCR - Lymphocytes T CD8⁺ - Répertoire T - TCR - Antigène