

Université de Montréal

**Étude de l'implication neurologique et immunologique de
la voie costimulatrice CD27/CD70 dans la sclérose en
plaques**

par Laurence Tremblay

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (MSc)
en microbiologie et immunologie

31 mai 2018

© Laurence Tremblay, 2018

Résumé

Introduction : La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique où des lymphocytes autoréactifs peuvent altérer l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (BHE) et transmigration dans le système nerveux central. La voie CD27/CD70 fournit un signal costimulateur régulant la fonction effectrice des lymphocytes. Notre laboratoire a montré que l'expression de CD70 est plus élevée sur les lymphocytes des patients SEP comparativement aux sujets sains. Notre hypothèse est que la voie CD27/CD70 est centrale au phénotype pathogénique pro-inflammatoire et à la transmigration des lymphocytes T à travers la BHE dans la SEP.

Méthode : L'étude de l'implication de la voie CD27/CD70 dans la transmigration lymphocytaire nécessite des cellules endothéliales de la BHE (CEBHE), un modèle *in vitro* de la BHE. Un essai de migration a évalué la capacité des cellules T polarisées en T_H1/T_H17 ou stimulées avec du TGF- β à traverser la BHE. L'expression de CD70 sur les CEBHE a aussi été examinée par cytométrie en flux, immunobuvardage de type Western et qPCR. De l'immunohistofluorescence a été effectuée sur des sections de cerveau de patients SEP afin d'y détecter des cellules CD27⁺/CD70⁺.

Résultats : L'expression de CD70 sur les CEBHE est augmentée en condition de culture pro-inflammatoire. Les lymphocytes T CD70⁺ polarisés en T_H1/T_H17 maintiennent leur profil pro-inflammatoire après leur transmigration à travers la BHE. Des cellules immunitaires CD70⁺/CD27⁺ sont présentes dans les lésions du cerveau des patients SEP.

Conclusion : La voie costimulatrice CD27/CD70 est impliquée dans la réponse inflammatoire dans le contexte de la SEP.

Mots-clés : Sclérose en plaques, CD27, CD70, système nerveux central, barrière hématoencéphalique, transmigration leucocytaire, maladie auto-immune

Abstract

Introduction: Multiple Sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease where pathogenic autoreactive lymphocytes, can disrupt the blood-brain barrier (BBB) integrity and transmigrate into the central nervous system. The CD27/CD70 pathway provides costimulatory signals that regulates lymphocyte effector function. Data obtained previously in our lab show that CD70 expression is higher on lymphocytes of MS patients compared to healthy controls. Our hypothesis is that the CD27/CD70 pathway is central to the proinflammatory pathogenic phenotype and migration of T lymphocytes seen in MS.

Method: CD27/CD70 implication in lymphocytic transmigration across the BBB was analyzed using human brain endothelial cells (BBB-EC), an *in vitro* model of the BBB. Migration assays assessed the capacity of T_H1 and T_H17-polarized or TGF- β -stimulated T cells to cross the BBB-EC. CD70 and CD27 expression on BBB-EC was examined by flow cytometry, western blot and qPCR. Immunohistofluorescence was performed on human MS brain sections to detect immune cells in the inflamed CNS that express CD27 and CD70.

Results: CD70 expression on BBB-EC is upregulated in proinflammatory culturing conditions. CD70⁺ T_H1 and T_H17-polarized lymphocytes maintain their proinflammatory profile after their transmigration across the BBB. CD70⁺ and CD27⁺ immune cells are present in lesions in the brain of MS patients.

Conclusion: The CD27/CD70 costimulatory pathway is involved in the inflammatory response in the context of MS.

Keywords : Multiple Sclerosis, CD27, CD70, central nervous system, blood-brain barrier, leukocyte transmigration, autoimmune disease

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
1. La sclérose en plaques.....	1
1.1 Manifestations cliniques et diagnostic.....	1
1.2 Pathologie générale.....	3
1.3 Populations de lymphocytes T pro-inflammatoires.....	6
1.4 Facteurs de risques.....	10
1.5 Traitements.....	14
2. La barrière hématoencéphalique.....	15
2.1 Composition de la barrière hématoencéphalique.....	15
2.2 Transmigration à travers la barrière hématoencéphalique.....	17
2.3 La barrière hématoencéphalique dans la sclérose en plaques.....	19
3. La voie CD27/CD70.....	21
3.1 Signalisation.....	22
3.2 La voie CD27/CD70 et les maladies auto-immunes.....	24
3.3 La voie CD27/CD70 et la sclérose en plaques.....	26
Hypothèse et objectifs.....	29
Matériels et méthodes.....	30
1. Isolation et culture de cellules immunitaires humaines.....	30
2. Isolation et cultures de cellules endothéliales de la BHE humaine.....	31
3. Marquages par la cytométrie en flux.....	32
4. Essai de transmigration.....	33

5. Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction.....	33
6. Immunobuvardage	34
7. Colorations histologiques et immunohistofluorescence de tissu du SNC humain ...	35
8. ELISA	37
9. Analyses statistiques.....	37
Résultats.....	38
1. CD70 est exprimé sur les CEBHE et son expression est augmentée en condition de culture pro-inflammatoire.	38
2. Les cellules T _H CD70 ⁺ présentent un profil inflammatoire après leur migration à travers les CEBHE	43
3. La stimulation des cellules T CD4 ⁺ <i>in vitro</i> avec du TGF- β , augmente la production de cytokines par les cellules ayant migré à travers les CEBHE	49
4. CD27 et CD70 sont exprimés sur différents sous-types de cellules immunitaires dans le SNC de patients atteints de la SEP	53
5. L'ajout de CD27 soluble favorise la différenciation en lymphocytes aux caractéristiques pro-inflammatoires.....	60
Discussion.....	63
Conclusion	72
Annexe	73
Bibliographie.....	74

Liste des figures

Figure 1.	Lésions démyélinisantes et infiltration de cellules immunitaires caractéristiques dans le cerveau d'un patient atteint de la SEP.	3
Figure 2.	Pathologie de la SEP à travers le temps.....	4
Figure 3.	Différenciation des cellules T CD4 ⁺ naïve en cellules effectrices.....	7
Figure 4.	Composition de la barrière hématoencéphalique.....	15
Figure 5.	Transmigration leucocytaire à travers la barrière hématoencéphalique	17
Figure 6.	CD70 est exprimé sur les CEBHE, mais pas sur les CMBHE ou les astrocytes provenant de tissu cérébral sain.....	40
Figure 7.	L'expression de CD70 sur les CEBHE est augmentée en condition de culture pro-inflammatoire.....	40
Figure 8.	La forme trimérique active de CD70 est présente en condition inflammatoire....	41
Figure 9.	La forme monomérique de CD27 n'est pas exprimée sur les CEBHE.....	41
Figure 10.	La forme soluble de CD70 est présente dans le surnageant des CEBHE.	42
Figure 11.	La forme soluble de CD70 est présente dans le LCR, mais pas dans le sérum de patients atteints de la SEP.....	42
Figure 12.	L'anticorps bloquant anti-CD70 n'a pas d'effet sur la migration des cellules polarisées en T _H 1 et T _H 17 à travers les CEBHE.....	44
Figure 13.	L'anticorps bloquant anti-CD70 n'a pas d'effet sur la production de cytokines par les cellules T _H 1 et T _H 17 ayant migré à travers les CEBHE.....	45
Figure 14.	Les cellules CD70 ⁺ polarisées en T _H 17 sont plus nombreuses à avoir migré à travers les CEBHE que les cellules CD70 ⁺ polarisées en T _H 1.	46
Figure 15.	Les cellules IL-17 ⁺ IFN- γ ⁺ CD70 ⁺ polarisées en T _H 17 sont plus nombreuses à avoir migré à travers les CEBHE que les cellules IL-17 ⁺ IFN- γ ⁺ CD70 ⁺ polarisées en T _H 1.	46
Figure 16.	Les cellules CD70 ⁺ GM-CSF ⁺ IL-17 ⁺ migrent davantage à travers les CEBHE que les cellules CD70 ⁻ GM-CSF ⁺ IL-17 ⁺	47
Figure 17.	Les cellules polarisées en T _H 1 et T _H 17 expriment CD27 de manière équivalente avant et après la migration à travers les CEBHE.....	48
Figure 18.	La transmigration des cellules T CD4 ⁺ stimulées avec du TGF- β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines est équivalente.....	50

Figure 19. Les lymphocytes T CD4 ⁺ stimulés avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines expriment CD70 de manière équivalente après leur migration.....	50
Figure 20. Les cellules CD70 ⁺ GM-CSF ⁺ IL-17 ⁻ et CD70 ⁺ IFN-γ ⁺ IL-17 ⁻ migrent davantage à travers les CEBHE que les cellules CD70 ⁻ GM-CSF ⁺ IL-17 ⁻ et CD70 ⁻ IFN-γ ⁺ IL-17 ⁻ lorsqu'elles sont stimulées avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines.	51
Figure 21. Les cellules polarisées ayant migré à travers les CEBHE expriment davantage CD27 que les cellules n'ayant pas migré.....	52
Figure 22. Des cellules CD4 ⁺ CD70 ⁺ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP.....	54
Figure 23. Des cellules CD4 ⁺ CD27 ⁺ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP.....	55
Figure 24. Des cellules CD8 ⁺ CD27 ⁺ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP.....	56
Figure 25. Des cellules CD8 ⁺ CD70 ⁺ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP.....	57
Figure 26. Des cellules CD11c ⁺ CD70 ⁺ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP.....	58
Figure 27. Des cellules CD20 ⁺ CD70 ⁺ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP.....	58
Figure 28. Des cellules CD4 ⁺ CD70 ⁺ se trouvent dans les lésions préactives et chroniques inactives du cortex et de la matière blanche dans le cerveau de patients atteints de la SEP. ...	59
Figure 29. Des cellules CD4 ⁺ CD27 ⁺ se trouvent dans les différents types de lésions du cortex et de la matière blanche dans le cerveau de patients atteints de la SEP.....	59
Figure 30. L'expression des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation en sous-types T _H 1 et T _H 17 semble augmenter suite à l'ajout de CD27 soluble.	61
Figure 31. L'ajout de CD27 soluble a un impact sur la production d'IL-17 et de GM-CSF par les cellules T CD4 ⁺	62
Figure 32. La voie costimulatrice CD27/CD70 est impliquée dans la réponse inflammatoire dans le contexte de la sclérose en plaques	71

Figure 33. Production d'IFN- γ , d'IL-17 et de GM-CSF par les cellules T CD3⁺CD4⁺ après 5 jours de stimulation avec du TGF- β en présence ou absence de CD27 soluble pendant deux ou trois jours..... 73

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ALCAM : *Activated leucocyte cell adhesion molecule*
AMN : Autres maladies neurologiques
AP1 : *Activator protein 1*
ARN : Acide ribonucléique
BHE : Barrière hématoencéphalique
BOC : Bandes oligoclonales
CCL : *Chemokine (C-C motif) ligand*
CCR : *C-C chemokine receptor*
CD : *Cluster of differentiation*
CEBHE : Cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique
CMBHE : Cellules méningées de la barrière hématoencéphalique
CPA : Cellules présentatrices d'antigène
CXCR : *C-X-C chemokine receptor*
CXCL : *Chemokine (C-X-C motif) ligand*
EAE : Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
EBV : *Epstein-Barr Virus*
ECGS - *Endothelial cell growth supplement*
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
EDSS : *Expanded Disability Status Scale*
FDA : *Food and Drug Administration*
FOXP3 : *Forkheadbox P3*
GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HLA : *Human leucocyte antigen*
ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule-1*
IFN γ : Interféron γ
IL : Interleukine
IL-2R α : *Interleukin-2 receptor alpha chain*
IRM : Imagerie par résonance magnétique

JAM : *Junctional adhesion molecule*
JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
KO : *Knockout*
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LFA-1 : *Leucocyte function-associated antigen-1*
LFB/H&E : Coloration au Luxol Fast Blue, à l'hématoxyline et à l'éosine
MAPK : *Mitogen activated protein kinase*
MCA : Milieu conditionné par les astrocytes
MCAM : *Melanoma cell adhesion molecule*
MOG : *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*
NFAT : *Nuclear factor of activated T cells*
NF κ B : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NK : *Natural killer*
O/N : *Overnight*
OPC: *Oligodendrocyte progenitor cell*
PBMC: *Peripheral blood mononuclear cells*
PBS: *Phosphate buffered saline*
PECAM-1: *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*
PI3K : *Phosphatidylinositol-3 kinase*
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPMS : *Primary progressive multiple sclerosis*
qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*
RAG : *Recombination activating gene*
ROR γ T : *RAR-related orphan receptor γ*
RRMS : *Relapsing-remitting multiple sclerosis*
SCI : Syndrome clinique isolé
SEP : Sclérose en plaques
SNC : Système nerveux central
SPMS : *Secondary progressive multiple sclerosis*
Tbet : *T-box transcription factor TBX21*
T_C: T cytotoxique

TGF- β : *Transforming growth factor β*

TNF: *Tumor necrosis factor*

T_H: *T helper*

TRAF: *TNF receptor-associated factor*

T_{Reg}: *T régulatrice*

VCAM-1: *Vascular cell adhesion protein-1*

VLA-4: *Very-late antigen-4*

À Manon et Marie, sources d'inspiration et de courage

Remerciements

Ces deux années de maîtrise ont été des plus formatrices. J'ai acquis de nouvelles connaissances scientifiques ainsi que de nouvelles compétences en laboratoire, mais j'ai aussi eu la chance d'apprendre beaucoup sur moi-même et de faire des rencontres uniques. Plusieurs personnes ont contribué à la réussite de ce projet, mais j'aimerais avant tout remercier le Dr Alexandre Prat de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire, un environnement stimulant qui favorise l'entraide et l'apprentissage.

Je dois aussi remercier ma superviseuse Dre Tessa Dhaeze pour ses conseils judicieux, son support constant, son énergie et son écoute. Son sens de l'organisation, son empathie et ses qualités d'enseignante ont fait de ces deux années une expérience formatrice. Nos longues soirées passées au laboratoire ainsi que nos expériences débutant à l'aurore ont été ponctuées de cafés, de chocolat, de rire et d'anecdotes et la complicité développée au fil du temps m'est très chère. Un merci bien spécial à Lyne Bourbonnière, affectueusement connue comme la maman du laboratoire, pour son dévouement continu, son aide, son écoute et sa générosité.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire, pour leur support, leurs conseils et les bons moments passés ensemble. Merci particulièrement à Camille Grasmuck et Catherine Lachance pour les très nombreux allers-retours au Mercanti, les discussions divertissantes et l'appui constant. Merci aussi à Rose-Marie Rébillard pour sa présence, son écoute et ses conseils et Dre Evelyn Peelen et Dre Stéphanie Zandee pour leur apport au niveau scientifique. Merci également à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce projet : Paula Lépine, Marc Charabati, Elizabeth Gowing, Jean-Philippe Ouimet, Hania Kebir et Sandra Larouche.

Je dois finalement prendre le temps de remercier ma famille et mes amis de m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ce processus, de mes balbutiements dans le laboratoire jusqu'à la remise de mon mémoire. Merci particulièrement à Louise, Caroline, Mehdi et Kevin d'avoir parsemé ses deux années de fous rires et de bons moments. Merci à mes parents, Françoise et Louis, mon frère Julien et ma sœur Véronique, qui savent toujours trouver les bons mots, qui me supportent inconditionnellement et sont présents pour les bons et les moins bons moments.

Introduction

1. La sclérose en plaques

La sclérose en plaques est une maladie idiopathique inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC). Cette maladie neurodégénérative est caractérisée notamment par la détérioration de la gaine de myéline entourant les axones, par l'altération de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (BHE) ainsi que par l'infiltration de cellules immunitaires provenant de la périphérie dans le SNC. À ce jour, aucun traitement curatif n'existe.

1.1 Manifestations cliniques et diagnostic

La sclérose en plaques (SEP) affecte plus de 2,5 millions de personnes dans le monde (Dendrou, Fugger, and Friese 2015; Runia, van Pelt-Gravesteijn, and Hintzen 2012), dont 100 000 Canadiens, ce qui fait du Canada l'un des pays où l'incidence de la SEP est la plus élevée au monde. Au niveau canadien, la prévalence de cette maladie est environ trois fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes et l'espérance de vie diminue de cinq ans chez les patients atteints de la SEP comparativement à l'ensemble de la population (Awankhah 2017). De plus, la qualité de vie est souvent inférieure chez les patients atteints de la SEP comparativement au reste de la population (Pohar et al. 2007). L'âge auquel la maladie débute est généralement entre 20 et 50 ans (Zurawski and Stankiewicz 2017).

Les patients atteints de la SEP peuvent présenter une variété de symptômes affectant les systèmes moteurs, sensoriels et autonomes tels que la perte de vision, le développement de déficiences cognitives, les tremblements, les vertiges, l'incoordination, les troubles d'équilibre, la dépression ou encore la fatigue (Thompson et al. 2018). Toutefois, certains symptômes sont plus typiques de la SEP, soit le symptôme de Lhermitte, caractérisé par une sensation de décharge électrique dans les membres suite à la flexion de la nuque et le phénomène d'Uhthoff, où les symptômes s'aggravent de manière transitoire et réversible suite à l'exercice ou la chaleur (Compston and Coles 2008).

Bien que les symptômes et l'évolution de la SEP peuvent être très hétérogènes d'un patient à l'autre, il est possible de catégoriser les différentes présentations de la maladie en sous-types distincts. La forme la plus commune de la SEP, affectant approximativement 85% des patients est la forme cyclique (RRMS- *relapsing-remitting multiple sclerosis*), qui est caractérisée par un épisode de dysfonction neurologique suivi d'une période de rémission clinique puis de d'autres poussées imprévisibles et de rémissions complètes ou partielles (Loma and Heyman 2011; Goldenberg 2012). Une poussée est définie comme l'apparition d'une lésion inflammatoire démyélinisante causant des symptômes neurologiques. Elle doit durer un minimum de 24 heures et se produire en absence d'infection ou de fièvre (Milo and Miller 2014). Éventuellement, les améliorations observées entre chaque rémission diminuent et environ 80% des patients développent la forme secondaire progressive de la maladie (SPMS- *secondary progressive multiple sclerosis*) (Goldenberg 2012). La forme progressive primaire (PPMS- *primary progressive multiple sclerosis*), représentant environ 15% des cas de SEP, est caractérisée par une lente accumulation de déficits à travers le temps, sans poussées clairement définies (Antel et al. 2012; Runia, van Pelt-Gravesteijn, and Hintzen 2012).

Le diagnostic de la SEP est effectué à l'aide de plusieurs critères. Certains patients présentent des symptômes cliniques caractéristiques de la SEP mais afin de confirmer le diagnostic, un examen d'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet d'identifier les lésions caractéristiques de la SEP. Également, une ponction lombaire peut être effectuée afin de récolter du liquide céphalo-rachidien (LCR) qui est ensuite analysé pour observer la présence de bandes oligoclonales (BOC). Ces dernières sont des immunoglobulines G spécifiques au LCR présentes chez près de 90% des patients atteints de la SEP, indiquant une activation immunitaire de type humorale (Palace 2001; Dobson et al. 2013). Les critères de McDonald sont utilisés pour le diagnostic final, et mettent de l'avant la nécessité d'avoir une dissémination des lésions dans le temps et dans l'espace (Thompson et al. 2018). Une fois que le diagnostic a été posé, l'outil le plus utilisé pour quantifier les handicaps et mesurer la progression de la maladie est l'EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) (Uitdehaag 2014).

1.2 Pathologie générale

Les lésions typiques de la SEP peuvent être observées partout dans le SNC et sont caractérisées par une infiltration de cellules immunitaires à travers la BHE. L'infiltration leucocytaire dans le SNC peut notamment causer de l'inflammation, la détérioration de la gaine de myéline, de la gliose et de la dégénération axonale (Dendrou, Fugger, and Friese 2015).

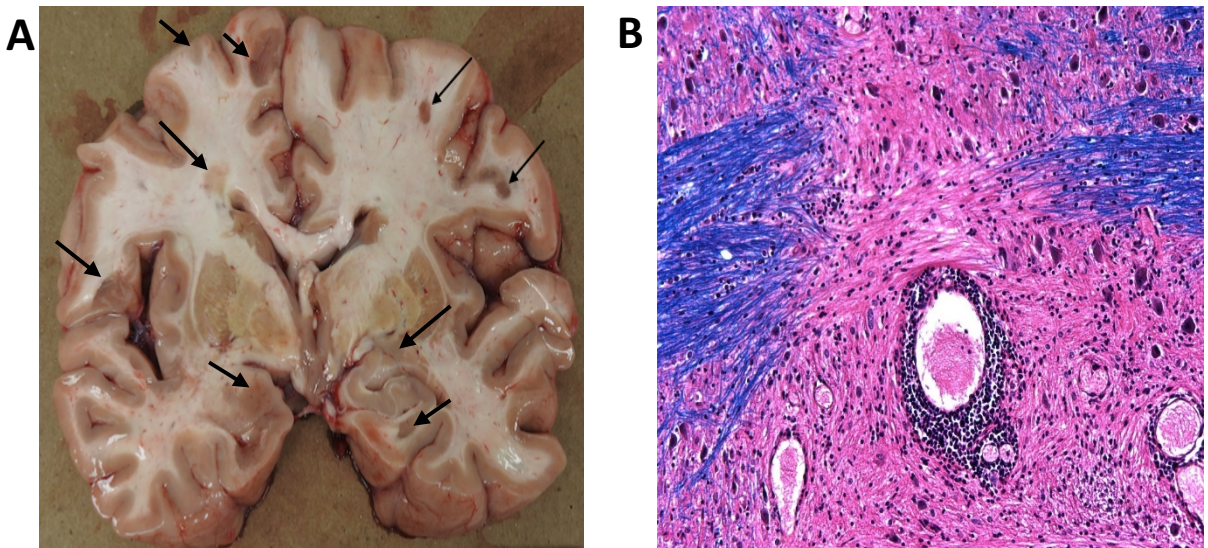


Figure 1. Lésions démyélinisantes et infiltration de cellules immunitaires caractéristiques dans le cerveau d'un patient atteint de la SEP.

(A) Coupe coronale du cerveau d'un patient atteint de SPMS lors d'une autopsie. Des lésions caractéristiques de la SEP sont visibles (flèches noires). (B) Coloration au Luxol-Fast blue et à l'hématoxyline & l'éosine permettant de marquer la myéline (bleu), la neuropile (rose) et les cellules nerveuses (mauve) ainsi que les noyaux, par l'hématoxyline, et le cytoplasme, par l'éosine, des cellules. Cette figure met en évidence la destruction de la myéline autour d'un vaisseau, qui est entouré d'un infiltrat de cellules immunitaires (Images obtenues et adaptées avec permission du laboratoire du Dr Alexandre Prat).

La myéline est une substance lipidique entourant les axones, qui permet la propagation rapide de l'influx nerveux. Cette dernière est synthétisée par les cellules gliales, soit les oligodendrocytes dans le SNC et les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (Miron, Kuhlmann, and Antel 2011). La destruction de la gaine de myéline est un effet pathologique caractéristique de la SEP. La myéline n'étant pas exclusivement retrouvée dans la matière blanche, la matière grise est également impliquée dans la démyélinisation observée dans

la SEP. Contrairement aux lésions de la matière blanche, parmi lesquelles on retrouve plusieurs cellules immunitaires et microglies, peu de leucocytes et de microglies sont présents dans les lésions corticales (Prins et al. 2015). De plus, il a été montré que les lésions corticales sont moins inflammatoires que les lésions de la matière blanche (Reich, Lucchinetti, and Calabresi 2018).

Ainsi, les différentes cellules immunitaires ayant infiltré le SNC, avec l'aide des microglies et des astrocytes activés résidents, provoquent la mort sélective d'oligodendrocytes et donc la destruction de la gaine de myéline et ce, à travers un contact direct entre les cellules ou encore à travers des facteurs inflammatoires et neurotoxiques sous forme soluble. Bien que tôt dans la maladie, les axones et neurones soient généralement préservés, ceux-ci vont éventuellement être endommagés par l'inflammation, ce qui corrèle avec une augmentation des symptômes et handicap du patient ainsi que de l'atrophie du cerveau (Dendrou, Fugger, and Friese 2015; Grigoriadis and van Pesch 2015). L'inflammation est quant à elle présente tout au long de la maladie, mais de manière plus prononcée dans les phases aiguës que dans les phases chroniques de la SEP.

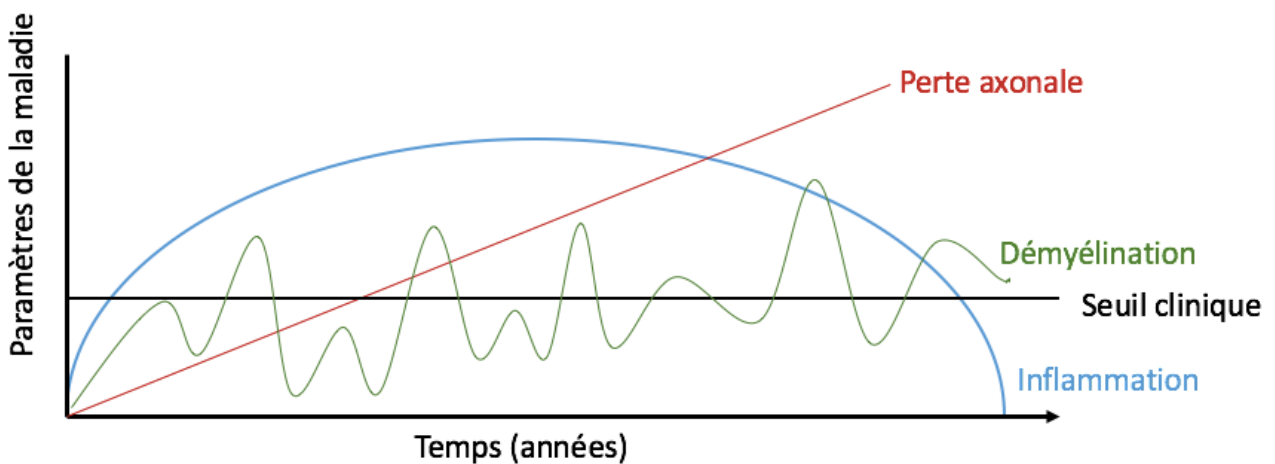


Figure 2. Pathologie de la SEP à travers le temps

Différents effets pathologiques observés chez les patients atteints de la SEP varient avec le temps. La démyélinisation fluctue avec les épisodes de remyélinisation, mais augmente tout de même avec le temps. La perte axonale augmente elle aussi à travers le temps alors que l'inflammation augmente puis diminue lors de la phase chronique de la maladie. (Figure adaptée d'une présentation donnée par le Dr Mark Freedman)

Le SNC est considéré par plusieurs comme un organe immunoprivilégié, puisqu'il est protégé par la BHE, qui ne laisse généralement passer que les molécules essentielles. Toutefois, dans le contexte de la SEP, une infiltration périvasculaire de cellules immunitaires a lieu suite à l'activation et la déstabilisation de la BHE. Ainsi, les leucocytes inflammatoires pouvant infiltrer le SNC sont les principaux responsables de la formation des lésions dans le cerveau des patients atteints de la SEP (Reich, Lucchinetti, and Calabresi 2018). Certaines populations lymphocytaires ont un rôle prépondérant dans la formation des lésions, notamment les cellules T CD8⁺, les cellules T CD4⁺ helper T_H1 et T_H17 (Kaskow and Baecher-Allan 2018) ainsi que les cellules B (Michel et al. 2015). Les macrophages et les cellules dendritiques sont aussi des acteurs importants (Chastain et al. 2011).

La remyélinisation, soit la réparation de la gaine de myéline, peut se produire de façon naturelle chez l'humain, bien que le taux auquel cela se produit diminue considérablement avec le temps, et devient éventuellement insuffisant pour pallier aux nombreux dommages axonaux observés dans le contexte de la SEP (Lemus, Warrington, and Rodriguez 2018). Ce processus est complexe, car il nécessite tout d'abord la migration de cellules multipotentes, appelées des cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC- *oligodendrocyte progenitor cell*) vers les zones de démyélinisation. Ces cellules vont par la suite se diviser et se différencier en oligodendrocytes matures qui pourront myéliniser à nouveau les axones dont la gaine de myéline a été endommagée (de la Fuente et al., 2015). La remyélinisation permet la restauration de la fonction neuronale et la prévention de la mort des neurones ainsi que des symptômes cliniques caractéristiques de la SEP (Olsen and Akirav, 2015).

1.3 Populations de lymphocytes T pro-inflammatoires

Tel que mentionné précédemment, l'infiltration des leucocytes dans le SNC suite à leur transmigration à travers la BHE est un élément central de la pathologie de la SEP. Toutefois, certains sous-types de cellules ayant migré peuvent être pro-inflammatoires alors que d'autres ont des fonctions anti-inflammatoires. Bien que plusieurs autres types cellulaires soient impliqués dans la pathologie et la formation de plaques, seules les différentes populations de lymphocytes T seront abordées dans cette section, puisque ce sont les types cellulaires étudiés dans ce mémoire.

1.3.1 Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

Les cellules T CD4⁺ naïves peuvent se différencier en divers sous-types. Bien que cette liste ne soit pas exhaustive, seuls les quatre sous-types principaux soit les cellules T helper T_H1, T_H2 et T_H17 et les cellules T régulatrices (T_{Reg}) seront discutés lors de ce mémoire. Chaque sous-type présente un phénotype précis et joue un rôle distinct dans la SEP.

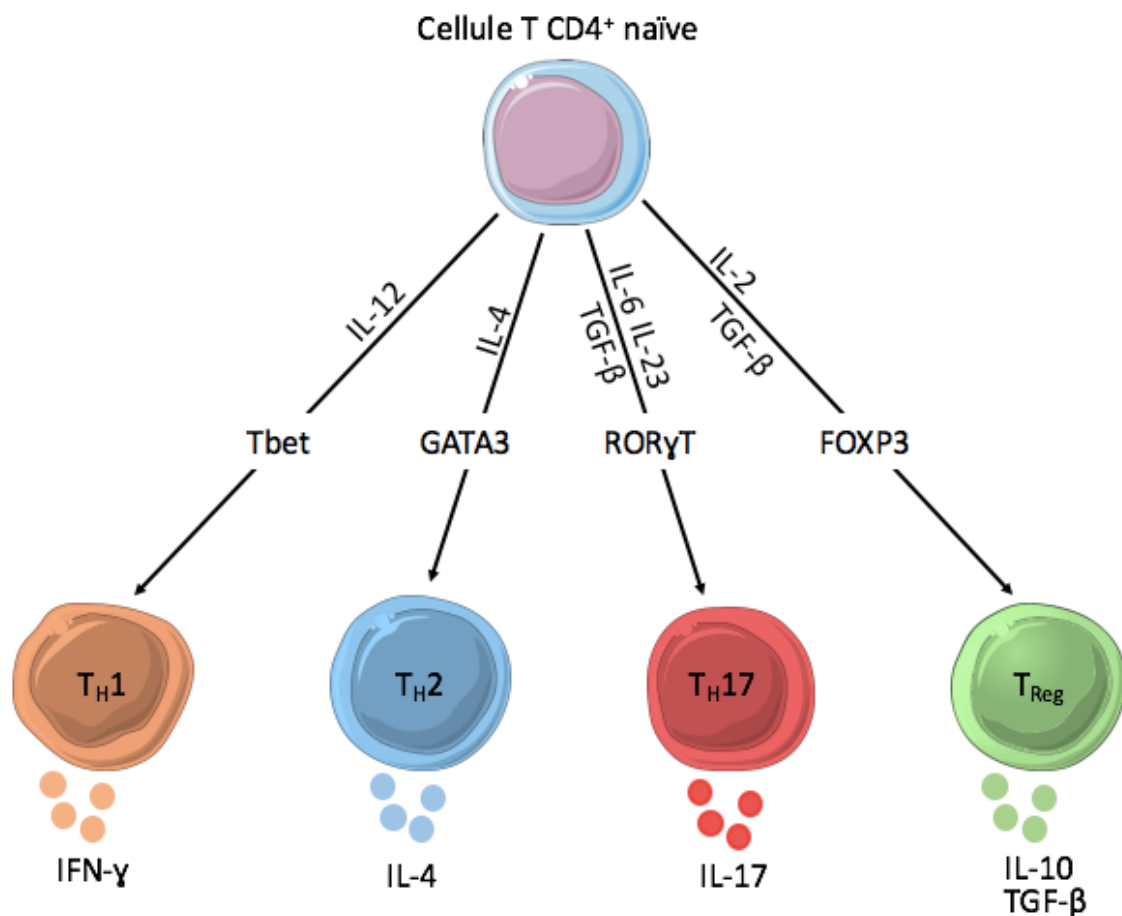


Figure 3. Différenciation des cellules T CD4⁺ naïve en cellules effectrices

Différents cytokines et facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en divers sous-type de cellules effectrices. Chacun des sous-types présente un phénotype distinct, notamment au niveau de la production des cytokines suite à leur différenciation. (Figure adaptée de (Magombedze et al. 2013; Sethi et al. 2013))

1.3.1.1 Les cellules T_H1

L'expression du facteur de transcription Tbet (*T-box transcription factor TBX21*) ainsi que la présence d'IL-12 (*IL - interleukine*), une cytokine produite par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), permettent de différencier les cellules T CD4⁺ naïves en cellules T_H1. Ces dernières produisent principalement de l'interféron γ (IFN-γ), mais aussi de l'IL-2 et du TNF-α (*Tumor necrosis factor α*). Elles sont généralement impliquées dans la protection contre les infections intracellulaires (Luckheeram et al. 2012; Kaskow and Baecher-Allan 2018). Il a été

montré que l'injection d'IFN- γ aux patients atteints de la SEP aggravait leurs symptômes (Panitch et al. 1987), ce qui a mené au concept que des cellules T_H1 spécifiques aux divers peptides de la myéline et produisant de l'IFN- γ induisent la démyélinisation. Ce type cellulaire peut également sécréter du GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), qui joue un rôle crucial dans l'inflammation du SNC médiée par les lymphocytes T (Codarri, Greter, and Becher 2013). L'IFN- γ et le GM-CSF sont présents dans le LCR et les lésions du SNC des patients atteints de la SEP, d'autant plus lors des phases actives de la maladie. Également, la quantité d'IL-12 retrouvée dans le LCR et le SNC des patients est plus élevée que chez les sujets sains (Link 1998).

1.3.1.2 Les cellules T_H2

Les cellules T_H2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 suite à leur différenciation par le facteur de transcription GATA3 et la cytokine IL-4. Elles sont impliquées dans la réponse immunitaire face aux infections parasitaires (Luckheeram et al. 2012). Ce sous-type cellulaire est considéré comme anti-inflammatoire et n'est pas impliqué directement dans la pathogenèse de la SEP.

1.3.1.3 Les cellules T_H17

Les cellules T_H17 produisent de l'IL-17 sous l'influence du facteur de transcription ROR γ T (*RAR-related orphan receptor γ T*) et des cytokines IL-6, IL-23 et TGF- β (*Transforming growth factor β*) (Luckheeram et al. 2012; Kaskow and Baecher-Allan 2018). L'impact de ce sous-type cellulaire a été étudié dans le contexte de la SEP. Les niveaux d'IL-17 détectés chez patients sont plus élevés que ceux observés chez les sujets sains, surtout lors des poussées. Des cellules T_H17 peuvent également être observées dans les lésions du SNC des patients (Kebir et al. 2007). Il a aussi été montré que les cellules T_H17 peuvent trans migrer plus efficacement que les cellules T_H1 à travers les CEBHE (Kebir et al. 2007). Les cellules T_H17 sécrètent elles aussi de l'IL-17 et l'on retrouve plus d'IL-23 dans le LCR et le SNC des patients atteints de la SEP comparativement aux sujets sains (Li et al. 2007). Tous ces facteurs indiquent que ce type cellulaire joue un rôle important dans la SEP.

1.3.1.4 Les cellules T_{Reg}

Le facteur de transcription FOXP3 (*Forkheadbox P3*) ainsi que l'IL-2 et le TGF- β permettent de différencier les cellules T CD4⁺ naïves en cellules T_{Reg}. Ces dernières produisent de l'IL-10 et du TGF- β . Elles servent principalement à préserver l'homéostasie immunitaire en tempérant la réponse inflammatoire (Luckheeram et al. 2012). Plusieurs études ont montré que l'expression de FOXP3 est diminuée et que les fonctions régulatrices des T_{Reg} sont altérées chez les patients atteints de SEP (Venken et al. 2008; Rostami and Ciric 2013). Certains traitements immunomodulateurs semblent avoir un impact positif sur les T_{Reg}, en restaurant leurs propriétés régulatrices (Legroux and Arbour 2015).

1.3.2 Les lymphocytes T CD8⁺

Les cellules T CD8⁺ sont classifiées comme étant cytotoxiques (T_C) et jouent un rôle important dans la SEP. Certains lymphocytes T peuvent en effet produire de l'IFN- γ (phénotype T_{C1}) ainsi que de l'IL-17 (phénotype T_{C17}). Des lymphocytes T CD8⁺ activés sont présents dans les lésions du SNC des patients (Tzartos et al. 2008), particulièrement du sous-type T_{C17}, et leur présence est aussi augmentée dans le LCR des patients atteints de SEP (Huber et al. 2013; Kaskow and Baecher-Allan 2018). Les lymphocytes T CD8⁺ sont retrouvés de manière prédominante dans les lésions du cerveau de patients atteints de la SEP (Sinha et al. 2015).

1.3.3 Plasticité

Les lymphocytes T peuvent faire preuve d'une certaine plasticité, puisqu'ils sont en mesure de changer de phénotype en fonction de leur environnement. À titre d'exemple, l'IL-23 peut entraîner la production d'IFN- γ , mais aussi d'IL-17 et les facteurs de transcription Tbet et ROR γ T peuvent être co-exprimés dans la même cellule (Kebir et al. 2009). Également, suite à leur entrée dans le SNC, les lymphocytes T_{H17} peuvent se convertir en cellules productrices d'IFN- γ (Hirota et al. 2011).

1.4 Facteurs de risques

La sclérose en plaques est une maladie complexe et jusqu'à maintenant, aucun facteur étiologique unique causant la maladie n'a pu être identifié. Toutefois, une variété de facteurs, autant génétique qu'environnementaux semblent jouer un rôle dans le développement de la SEP.

1.4.1 Génétique

Les personnes dont un ou plusieurs membres de la famille immédiate sont affectés par la SEP ont un plus grand risque de développer la maladie (2-4% comparativement à 0,1% dans la population générale) (Reich, Lucchinetti, and Calabresi 2018). Plus de 200 variations génétiques ont été identifiées comme pouvant jouer un rôle dans le développement de la maladie et la majorité des allèles identifiés sont liés à diverses voies immunitaires (Canto and Oksenberg 2018; Beecham et al. 2013). Les variantes génétiques liées au HLA (*human leukocyte antigen*) affectent le répertoire des cellules T et définissent la spécificité de la maladie pour le SNC (Dendrou, Fugger, and Friese 2015). Celle ayant un plus grand impact est l'haplogroupe HLA DRB1*1501, où le OR (*odds ratio*) est de 3,08 (Hollenbach and Oksenberg 2015). Les variantes non-HLA agissent, quant à elles, plus au niveau du seuil d'activation des cellules immunitaires. Ces variantes incluent notamment des gènes importants au niveau des voies des cytokines tels que CXCR5 (*C-X-C chemokine receptor*) et IL-2RA (*Interleukin-2 receptor alpha chain*) ou encore d'autres gènes étant impliqués dans la costimulation tel que CD40 (*CD- cluster of differentiation*) et CD80 (Sawcer et al. 2011). Toutefois, il est important de noter qu'aucun des gènes identifiés jusqu'à maintenant ne peut être utilisé afin de déterminer ou prédire le développement clinique de la SEP (Reich, Lucchinetti, and Calabresi 2018). Au niveau épigénétique, la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), les modifications des histones ainsi que le silençage post-transcriptionnel des gènes associés au micro-ARN (acide ribonucléique) ont tous été étudiés dans le contexte de la SEP. Au niveau des cellules immunitaires, la régulation épigénétique pourrait mener à une augmentation de l'expression des gènes associés à la maladie alors qu'au niveau du cerveau, cela pourrait altérer la capacité des progéniteurs à former de la nouvelle myéline (Koch, Metz, and Kovalchuk 2013; Huynh and Casaccia 2013).

1.4.2 Les facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs de risques environnementaux ont été identifiés dans les dernières années comme étant impliqués dans le développement de la SEP mais aussi dans l'évolution de la maladie chez des patients qui en sont déjà atteints. Dans cette section, les principaux facteurs de risques environnementaux seront examinés ainsi que leur impact sur potentiel sur le SNC et le système immunitaire.

1.4.2.1 Les agents infectieux

Divers agents infectieux ont été étudiés afin de déterminer lesquels agissent comme des facteurs de risques dans le développement de la sclérose en plaques. Le contributeur le plus important ayant été identifié à ce jour est le virus Epstein-Barr (EBV- *Epstein-Barr Virus*), soit l'agent étiologique responsable de la mononucléose infectieuse. Plusieurs études ont démontré une corrélation positive entre des niveaux élevés d'anticorps spécifiques pour l'EBV et une augmentation du risque de développement de la SEP. La même tendance est observée pour les patients ayant des antécédents de mononucléose infectieuse (Belbasis et al. 2015; Operskalski et al. 1989). Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer le rôle potentiel de l'infection à l'EBV dans le développement de la SEP. L'un des mécanismes proposés est que l'infection sous forme latente n'est pas régulée efficacement, ce qui mène à la réactivation du virus dans le SNC (Lossius et al. 2014). Une autre hypothèse suggère que L'EBV jouerait un rôle au niveau de la dérégulation globale du système immunitaire, comme c'est le cas dans d'autres maladies auto-immunes tel que le lupus érythémateux (Munz et al. 2009).

1.4.2.2 La latitude géographique et la vitamine D

La latitude géographique a été identifiée comme l'un des facteurs de risque environnemental impliqué dans le développement de la SEP puisque la prévalence de cette maladie est nettement augmentée entre 45° et 65° par rapport à l'équateur (Wade 2014). La latitude géographique est liée aux saisons et donc à l'exposition à la lumière du jour et la prévalence de la SEP est moindre dans les régions où l'exposition aux rayons UV est augmentée (Correale, Ysrraelit, and Gaitan 2009). Chez l'humain, une des voies permettant de synthétiser la vitamine D est à travers

l'exposition à la lumière du soleil. Ainsi, différentes études ont mis en évidence une association entre une carence en vitamine D et le développement de la SEP. Cette insuffisance peut augmenter les risques de poussées ou encore entraîner le développement d'un handicap avancé chez l'humain (Smolders et al. 2011). Il a été démontré qu'une augmentation du niveau de vitamine D dans la circulation a un effet de protection contre le déclenchement de la SEP puisque sous sa forme biologiquement active, elle peut agir sur le système immunitaire, notamment au niveau de la modulation de la réponse adaptative. En effet, la vitamine D peut modifier la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en cellules T_{Reg} ainsi qu'en cellules T_H, afin de promouvoir le développement d'un environnement non-inflammatoire. Cela mène donc à une augmentation de la différenciation et des capacités répressives des T_{Reg} et une diminution de la différenciation en T_{H1} et T_{H17} ainsi que de la production d'anticorps par les cellules B (Hart, Gorman, and Finlay-Jones 2011; Baeke et al. 2010).

1.4.2.3 Le tabagisme

Plusieurs études ont été réalisées afin d'explorer l'impact du tabagisme non seulement au niveau du risque de développement de la SEP mais aussi, dans l'évolution de la maladie. Une relation dose-réponse a pu être identifiée entre la quantité de cigarettes consommées et le risque de développer la SEP (Hedstrom et al. 2013; Handel et al. 2011). Au niveau de l'évolution de la SEP, le tabagisme est associé à un plus grand risque de développer une forme progressive de la maladie. De plus, il semble y avoir plus d'inflammation et d'atrophie cérébrale visible par imagerie chez les patients qui fument (O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012; Hernan et al. 2005). Bien que les mécanismes affectant la susceptibilité et la progression de la SEP n'ont pas été clairement identifiés à ce jour, le fait de fumer semble lié à l'initiation d'une réponse de type T helper 17 dans les poumons (O'Gorman, Lucas, and Taylor 2012; Hernan et al. 2005; Baecher-Allan, Kaskow, and Weiner 2018).

1.4.2.5 L'obésité

L'obésité chez les enfants et les adolescents est associée à un risque plus élevé de développer la SEP. Bien que les mécanismes expliquant cette association demeurent inconnus à ce jour, certaines hypothèses peuvent être émises. L'obésité est associée à un taux faible, mais chronique d'inflammation, ce qui pourrait augmenter le risque de recrutement de cellules T CD4⁺ qui ciblent les antigènes du SNC, à travers l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, la promotion d'une réponse T_H1 et une diminution du nombre de cellules T régulatrice (Hedstrom et al. 2014; Palavra et al. 2016). Également, un indice de masse corporelle élevé corrèle avec un taux de vitamine D circulant plus bas, ce qui pourrait augmenter le risque de développer la SEP (Munger et al. 2006; Palavra et al. 2016). Finalement, l'expression du récepteur de la leptine, une hormone impliquée dans l'appétit et les réserves de graisse, est augmentée sur les cellules T CD8⁺ et les monocytes de patients en poussées comparativement aux patients en rémission ou au sujet sains, ce qui pourrait indiquer un rôle de ce récepteur dans le développement de poussées (Frisullo et al. 2007; Palavra et al. 2016).

1.5 Traitements

La FDA (*Food and Drug Administration*) avait, en décembre 2017, accepté quinze médicaments modificateurs de l'évolution de la maladie, aussi appelés immunomodulateurs. Ceux-ci sont cependant approuvés uniquement pour la RRMS et réduisent la probabilité de développer de nouvelles lésions de la matière blanche ainsi que des poussées (Reich, Lucchinetti, and Calabresi 2018). Les mécanismes d'action et les effets des traitements les plus connus seront discutés ici-bas. Il est toutefois important de noter qu'un seul des traitements a montré de bénéfices clairs dans le cas des formes progressives de la maladie (Torkildsen, Myhr, and Bo 2016; Ciotti and Cross 2018).

L'interféron bêta et l'acétate de glatiramère sont des traitements de première ligne. Le premier agit en augmentant l'expression et la concentration de médiateurs anti-inflammatoires, tout en diminuant l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Il pourrait également agir en réduisant la transmigration de cellules immunitaires inflammatoires à travers la BHE. Au niveau clinique, cela se manifeste par une diminution de l'atrophie cérébrale, des symptômes et de l'activité des lésions visibles par IRM (Kieseier 2011; Dhib-Jalbut and Marks 2010). L'acétate de glatiramère agit quant à elle au niveau de l'immunité innée et adaptative, notamment en altérant la fréquence de sécrétion des cytokines et la présentation par les cellules présentatrices d'antigènes. Elle a également un rôle au niveau de la neuroprotection (Ziemssen and Schrempf 2007; Aharoni 2013). Les traitements de deuxième ligne incluent notamment le natalizumad et le fingolimod. Le natalizumad est un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine alpha-4 qui réduit la fréquence des poussées et ralentit la progression des symptômes. Il bloque l'adhérence des leucocytes à la BHE, limitant ainsi les possibilités de transmigration dans le SNC (Polman et al. 2006). Le fingolimod peut se lier au récepteur à sphingosine-1-phosphate exprimé par les lymphocytes, causant ainsi son internalisation (Ward, Jones, and Goldman 2014; Willis and Cohen 2013). Cela mène à une augmentation de la rétention des leucocytes dans les ganglions lymphatiques, ce qui limite le risque de poussées et entraîne une réduction du nombre de nouvelles lésions (Agius et al. 2014).

Plusieurs nouveaux traitements à l'étude cherchent maintenant à empêcher l'activation et l'entrée des lymphocytes T, plus spécifiquement des cellules T_H1 et T_H17, dans le SNC (Goldenberg 2012).

2. La barrière hématoencéphalique

Le système nerveux central est reconnu par plusieurs comme étant l'un des organes immunoprivilégiés du corps humain et ce, bien qu'il existe un système lymphatique au niveau des méninges qui draine les constituants cellulaires et solubles du LCR jusqu'aux ganglions cervicaux profonds (Louveau, Harris, and Kipnis 2015). La barrière hématoencéphalique est un réseau vasculaire complexe qui forme une barrière cellulaire continue entre le SNC et la circulation systémique. La BHE permet de réguler l'homéostasie du SNC, qui est essentielle afin de maintenir la fonction neuronale, mais aussi de protéger le SNC des toxines, des pathogènes, de l'inflammation et des maladies (Daneman and Prat 2015). Les vaisseaux méningés et les plexus choroïdes peuvent aussi agir à titre de barrières cellulaires (Dragunow 2013), mais ne seront pas abordés puisque ce projet de recherche se concentre sur les cellules endothéliales de la BHE.

2.1 Composition de la barrière hématoencéphalique

La BHE est formée principalement de cellules endothéliales entourées de membranes basales vasculaires, de péricytes et d'astrocytes. Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des protéines jonctionnelles (Takeshita and Ransohoff 2012).

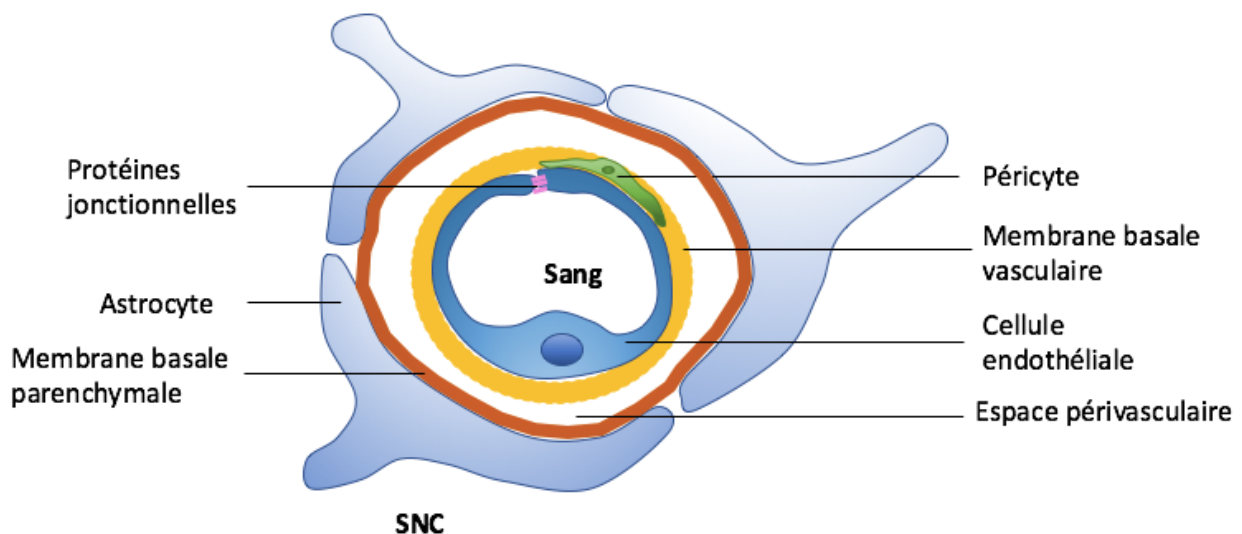


Figure 4. Composition de la barrière hématoencéphalique

(Tirée avec permission du mémoire de Paula Lépine)

La BHE se retrouve au niveau des capillaires et veinules. C'est à cet endroit qu'on lie les échanges entre le sang et le SNC. Les CEBHE qui sont en contact direct avec le sang n'ont pas de fenestration, ont des capacités pycnotiques diminuées, une haute densité mitochondriale et possèdent des jonctions serrées et adhérentes qui empêchent le passage transcellulaire de molécules à travers la BHE (Spencer, Bell, and DeLuca 2018). Ces cellules possèdent toutefois divers transporteurs exprimés au niveau de la membrane luminale et qui permettent l'apport de nutriments aux cellules du SNC, tout en expulsant les métabolites toxiques du SNC vers le sang (Keaney and Campbell 2015).

La membrane basale vasculaire ainsi que les péricytes sont impliqués dans le développement et le maintien de la BHE. Les péricytes jouent un rôle essentiel dans le maintien de la fonction des capillaires cérébraux (Spencer, Bell, and DeLuca 2018; Hagan and Ben-Zvi 2015). Cette membrane est composée de protéines extracellulaires telles que la fibronectine qui contribuent à limiter le passage de molécules et de cellules provenant de la périphérie dans la SNC. La membrane basale parenchymale est quant à elle produite par les astrocytes (Larochelle, Alvarez, and Prat 2011; Daneman and Prat 2015; Takeshita and Ransohoff 2012). Les astrocytes fournissent un lien cellulaire entre les circuits neuronaux et les vaisseaux sanguins. Ils peuvent donc transmettre des signaux qui régulent le flux sanguin en réponse à l'activité neuronale (Daneman and Prat 2015). L'interaction entre les astrocytes et les cellules endothéliales est cruciale dans la régulation du phénotype de la BHE, notamment au niveau de son rôle dans l'angiogenèse, l'expression des protéines de jonction serrée et la morphologie (Spencer, Bell, and DeLuca 2018; Zlokovic 2008).

2.2 Transmigration à travers la barrière hématoencéphalique

La BHE est responsable de réguler la transmigration des leucocytes du sang au SNC. En condition physiologique, des cellules immunitaires peuvent traverser la BHE afin d'effectuer la surveillance immunitaire du SNC (Zlokovic 2008). Cette transmigration s'effectue en plusieurs étapes distinctes soit le roulement, l'adhésion, l'adhérence ferme et l'arrêt, suivi de la diapédèse (Schéma 6). La liaison entre des molécules d'adhérences de l'endothélium de la BHE et des leucocytes et leurs ligands régule chacune des étapes (Engelhardt and Ransohoff 2012).

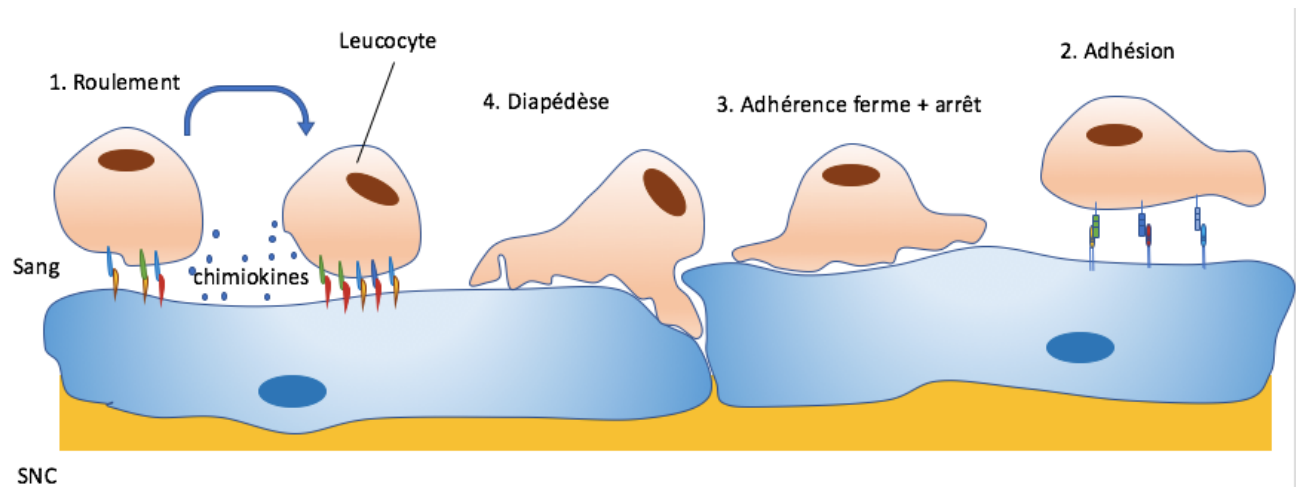


Figure 5. Transmigration leucocytaire à travers la barrière hématoencéphalique

(Tirée avec permission du mémoire de Paula Lépine)

En condition physiologique, l'accès des cellules immunitaires au SNC est limité puisque la BHE et les leucocytes expriment peu de molécules d'adhérence et leurs ligands. Toutefois, la présence d'inflammation mènera à une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence cellulaire sur les cellules endothéliales et de leurs ligands sur les leucocytes, qui favorisent l'interaction entre ces deux types cellulaires (Zlokovic 2008; Keaney and Campbell 2015; Zhao et al. 2015). Ainsi, lors de l'étape de roulement, les leucocytes effectuent un contact transitoire avec l'endothélium vasculaire, notamment grâce à l'interaction avec des molécules d'adhérence de la famille des sélectines, et cela réduit leur vitesse (Engelhardt and Ransohoff 2012). Ensuite, la production de chimiokines par les cellules endothéliales, par exemple CXCL12 (*CXCL-chemokine (C-X-C motif) ligand*), augmente l'avidité des récepteurs des chimiokines tel que CXCR4 sur les leucocytes et entraîne un changement de conformation des intégrines (Johnston

and Butcher 2002; Engelhardt 2008). Cela entraîne l'activation de VLA-4 (*very-late antigen-4*) et LFA-1 (*leucocyte function-associated antigen-1*) à la surface des leucocytes et leur liaison avec VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein-1*) et ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) sur les cellules endothéliales. Cela facilite l'arrêt des cellules, qui mènera ultimement à l'adhérence de ces cellules immunitaires à la BHE (Takeshita and Ransohoff 2012; Ley et al. 2007; Greenwood et al. 2011). Une fois que les cellules immunitaires ont adhéré à la BHE, les voies transcellulaires ou paracellulaires permettent la migration à travers le BHE. La migration transcellulaire a lieu dans les endroits où l'endothélium est plus mince. La liaison d'ICAM1 entraîne des événements de signalisation cytoplasmiques qui provoquent la formation de canaux par lesquels les lymphocytes peuvent migrer. Ces canaux sont stabilisés par la présence d'actine et de vimentine (Ley et al. 2007). La migration paracellulaire implique l'augmentation transitoire du taux de calcium intracellulaire des cellules endothéliales (Muller 2003) suivi d'une réorganisation des molécules jonctionnelles se trouvant sur les cellules endothéliales. PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), CD99 et JAM-A (*junctional adhesion molecule*) sont recrutés au site de diapédèse afin de faciliter la transmigration (Ley et al. 2007; Engelhardt and Ransohoff 2012). La migration peut être favorisée par la sécrétion de cytokines et de métalloprotéinases provenant de la matrice, qui affecte l'intégrité de la matrice extracellulaire et des jonctions serrées. Une fois les leucocytes dans l'espace périvasculaire, des cellules présentatrices d'antigène doivent activer les leucocytes pour que ceux-ci puissent franchir la membrane limitante gliale (Man, Ubogu, and Ransohoff 2007).

2.3 La barrière hématoencéphalique dans la sclérose en plaques

L'altération de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique est l'une des caractéristiques importantes dans la pathologie de la SEP. Les leucocytes activés des patients atteints de la SEP peuvent augmenter la perméabilité de la BHE en sécrétant notamment des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs solubles, des dérivés réactifs de l'oxygène et des métalloprotéinases de la matrice (Larochelle, Alvarez, and Prat 2011; Ortiz et al. 2014; Minagar and Alexander 2003).

En effet, l'expression des cytokines telles que le TNF- α et l'IFN- γ par les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC-*peripheral blood mononuclear cells*) est élevée et dans le sérum des patients atteints de la SEP. Leur présence entraîne une augmentation de l'expression de divers chimiokines, notamment CCL2 (*chemokine (C-C motif) ligand*), CXCL8, CCL5 et CXCL10. Ces chimiokines mènent à un accroissement de l'adhérence des leucocytes aux CEBHE et leur migration à travers les cellules endothéliales (Larochelle, Alvarez, and Prat 2011; Chui and Dorovini-Zis 2010; Minagar and Alexander 2003). Ces cytokines augmentent aussi l'expression de diverses molécules d'adhérence telles que ICAM-1, VCAM-1, ALCAM (*activated leucocyte cell adhesion molecule*) et MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*), ce qui fait en sorte que les lymphocytes activés peuvent interagir de manière efficace avec les cellules endothéliales (Larochelle, Alvarez, and Prat 2011; Ortiz et al. 2014).

De plus, les dérivés réactifs de l'oxygène sont produits par les macrophages et les microglies activés lors du développement des lésions démyélinisantes (Gray et al. 2008). Ces derniers peuvent altérer les protéines jonctionnelles, notamment en modifiant leur état de phosphorylation, ce qui affecte la perméabilité de la BHE (Haorah et al. 2005). Ils peuvent également mener à des dommages aux oligodendrocytes ainsi qu'à la dégénération axonale (Dutta et al. 2006). Certains leucocytes migrant à travers la BHE peuvent aussi produire des dérivés réactifs de l'oxygène suite à leur interaction avec les cellules endothéliales (Pun, Lu, and Moolchala 2009).

L'infiltration de cellules immunitaires dans le SNC corrèle avec la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17, l'IL-22, le GM-CSF, l'IFN- γ et le TNF. Ces cytokines sont impliquées dans la modulation des fonctions des cellules endothéliales, notamment en augmentant l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et en affectant l'expression des protéines jonctionnelles, ce qui affecte ultimement la perméabilité de la BHE(Alvarez, Cayrol, and Prat 2011; Daneman and Prat 2015; Holman, Klein, and Ransohoff 2011). Ainsi, bien que la BHE protège le SNC contre l'inflammation en limitant l'accès des cellules immunitaires au cerveau, elle peut aussi réguler la réponse inflammatoire locale en exprimant des molécules pro-inflammatoires qui mènent au recrutement de cellules immunitaires périphériques dans le SNC.

Par conséquent, l'ensemble de ces substances affecte l'architecture des jonctions serrées, altère les protéines de la membrane basale et augmente l'expression de chimiokines et de molécules d'adhérence cellulaire par les cellules endothéliales de la BHE. Ceci entraîne ultimement une augmentation de la perméabilité de la BHE et de la transmigration des leucocytes dans le SNC, ce qui entraîne le développement de lésions caractéristiques de la SEP (Larochelle, Alvarez, and Prat 2011; Ortiz et al. 2014; Minagar and Alexander 2003).

3. La voie CD27/CD70

Afin de développer une réponse T efficace, la reconnaissance de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité n'est pas suffisante. Un signal de costimulation est nécessaire afin d'améliorer l'activation initiale, la division et la survie cellulaire ainsi que l'induction des fonctions effectrices telles que la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité (Croft 2003). Les molécules de la famille des TNF peuvent fournir ce signal de costimulation, plus spécifiquement au niveau de la survie cellulaire (Croft 2009). Elles peuvent aussi agir en synergie avec les récepteurs des cellules T afin de permettre la progression à travers le cycle cellulaire et ainsi, promouvoir la division en cellules T et la production de cytokines (Watts 2005). Plusieurs membres de la famille des TNF peuvent jouer un rôle dans le développement d'une réponse lymphocytaire efficace, mais ce projet se concentre spécifiquement sur CD27 et CD70.

CD27 est un récepteur monomérique transmembranaire de type I qui devient trimérique suite à son interaction avec son ligand (Locksley, Killeen, and Lenardo 2001). Il possède des domaines riches en cystéine ainsi que des sites de liaison à TRAF (*TNF receptor-associated factor*) (Wajant 2016). CD27 est exprimé sur les lymphocytes T naïfs de manière constitutive. Toutefois, son expression diminue après une stimulation prolongée (Lens et al. 1998). De plus, les cellules T centrales mémoires et transitoires mémoires expriment CD27 alors que les cellules T effectrices mémoires ne l'expriment pas (Riou 2007). CD27 est également exprimé sur les cellules NK (*natural killer*) (Hayakawa and Smyth 2006; Silva et al. 2008) et les cellules B mémoires (Agematsu 2000). CD27 existe aussi sous forme soluble, correspondant au domaine extracellulaire de la forme membranaire, et est clivé par les métalloprotéinases matricielles ou par épissage alternatif (Kato et al. 2007; Loenen et al. 1992). Cette forme soluble peut servir de marqueur diagnostique pour l'activation des cellules T. CD27 est impliqué entre autres dans la survie et la production de cytokines par les lymphocytes T (Lens et al. 1998).

CD70 est une protéine homotrimérique transmembranaire de type II (Locksley, Killeen, and Lenardo 2001) et l'unique ligand de CD27 (Hintzen et al. 1994). Cette protéine est exprimée principalement sur les présentatrices d'antigènes, soit les cellules dendritiques matures et les lymphocytes B activés, ainsi que sur les cellules NK et les lymphocytes T activés (Jacobs et al.

2015). Les cellules T centrales, effectrices et transitoires mémoires expriment CD70 (Yang et al. 2014; Park et al. 2014). CD70 est uniquement exprimé après activation sauf au niveau des cellules épithéliales médullaires thymique, des cellules dendritiques de la médulla thymique (Coquet, Ribot, et al. 2013) ainsi que sur les cellules CD11c^{low} de la lamina propria intestinale sur lesquelles CD70 est toujours exprimé (Atarashi et al. 2008). Il a été montré que CD70 peut être exprimé par des cellules non immunitaires, soit sur les cellules endothéliales se trouvant au niveau du myocarde, en conditions inflammatoires (Seko et al. 2002).

3.1 Signalisation

La liaison de CD70 se trouvant à la surface des cellules présentatrices d'antigènes à CD27 sur les cellules T fournit un signal de costimulation (Hintzen et al. 1995) via TRAF2 et TRAF5, qui activera ultimement les voies de signalisation NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), AP1 (*activator protein 1*) et NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (Akiba et al. 1998; Seko et al. 2002; Cannons, Choi, and Watts 2000). Ces voies de signalisation, une fois activées, sont impliquées dans la production de plusieurs cytokines, notamment l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IFN-γ. Ces voies agissent aussi au niveau de l'augmentation de l'expression de récepteurs de cytokines tels que l'IL-12Rα et l'IL-12Rβ, qui peuvent induire le développement des cellules T CD4⁺ naïves en sous-type T_H1 chez l'humain (van Oosterwijk et al. 2007). L'incubation de cellules T_{Reg} en présence de cellules dendritiques exprimant CD70 mène aussi à une augmentation de la sécrétion d'IFN-γ et de TNF-α et de l'expression du facteur de transcription Tbet, ce qui indique une reprogrammation de ces cellules vers un phénotype T_H1 (Pen et al. 2013). Cette association entre l'expression de CD70 et développement des cellules T CD4⁺ est aussi visible chez la souris. En effet, l'expression de CD70 sur les cellules dendritiques, même en absence d'IL-12, mène à la production d'IFN-γ par des cellules T CD4⁺ de phénotype T_H1 (Dhainaut et al. 2015; Soares et al. 2007). Dans un modèle de souris transgénique où CD70 est exprimé de manière constitutive sur les cellules B, une diminution de la quantité de cellules B dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes est observée, causée par la production d'IFN-γ par les cellules T (Arens et al. 2001). L'expression de CD70 est aussi essentielle pour la différenciation en cellules de sous-type T_H17 dans l'intestin (Coquet, Middendorp, et al. 2013).

L'expression de CD70 sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) est quant à elle induite par les récepteurs de type Toll, CD40 et par des médiateurs pro-inflammatoires (Hashimoto-Okada et al. 2009). Ces signaux, ainsi que l'expression d'un certain nombre de molécules costimulatoires à la surface des CPA, sont essentiels afin d'activer les cellules T naïves. Bien que la signalisation des lymphocytes CD27⁺ ait été étudiée en profondeur, il y a peu d'information à ce jour sur les voies de signalisation intracellulaires impliquées pour les lymphocytes T exprimant CD70 à leur surface. Il a été démontré que CD70 peut activer les voies de signalisation reliées à PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) et au MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (Arens et al. 2004; Garcia et al. 2004). Au niveau des cellules B, CD70 régule le cycle cellulaire alors qu'au niveau des cellules NK, son expression peut entraîner la cytotoxicité (Borst, Hendriks, and Xiao 2005). Plusieurs ligands de la famille des TNF peuvent se retrouver sous forme soluble, soit par protéolyse de la tige ou encore par épissage alternatif (Wajant 2016). La présence naturelle d'une forme soluble de CD70 et ses fonctions potentielles ont fait l'objet de débat, bien qu'il ait été montré que quelques variantes solubles peuvent se lier au CD27 (Cormary et al. 2004; Miller et al. 2010; Wyzgol et al. 2009).

Ainsi, l'interaction CD27-CD70 est essentielle lors des étapes initiales de la réponse des lymphocytes T, notamment au niveau de la prolifération cellulaire et de la sécrétion de cytokines. Plusieurs études *in vitro* ont montré que lorsque cette interaction est perturbée, le niveau de prolifération est faible et la sécrétion de cytokines pratiquement inhibée. Des résultats similaires sont observés dans des souris KO (*Knockout*) ne possédant pas CD27 (Croft 2003).

3.2 La voie CD27/CD70 et les maladies auto-immunes

Plusieurs études ont démontré que la voie CD27/CD70 est impliquée dans la pathogenèse de diverses maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux (Han, Olsen, and Bottaro 2016; Park et al. 2014).

Par exemple, les cellules CD4⁺CD70⁺ sont plus nombreuses dans le sang périphérique des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde comparativement aux sujets sains et elles produisent plus de cytokines pro-inflammatoires, notamment de l'IFN- γ et de l'IL-17, suite à leur activation. Également, ces cellules expriment plus de ROR γ T que les cellules CD4⁺CD70⁻ (Park et al. 2014). De plus, dans le modèle murin de la polyarthrite rhumatoïde induit par le collagène, le traitement des souris malades avec un anticorps anti-CD70 a mené une diminution de la production d'auto-anticorps spécifiques au collagène, une diminution de la sévérité de la maladie et une réduction de l'inflammation (Ofiazoglu et al. 2009).

Au niveau du lupus érythémateux, les lymphocytes T CD4⁺CD70⁺ sont significativement plus nombreux dans le sang des patients comparativement aux sujets sains. La majorité des cellules T CD4⁺CD70⁺ présentent aussi un phénotype de cellule mémoire (Han et al. 2005).

En ce qui a trait au rôle de CD27 et CD70 dans les maladies inflammatoires de l'intestin, des études ont été effectuées dans deux modèles murins de colite. Le transfert de lymphocytes T CD27⁻CD4⁺ naïfs dans des souris déficientes pour RAG (*recombination activating gene*), n'ayant pas de cellules T et B (Mombaerts et al. 1992), a montré que ces cellules sont significativement moins pathogéniques que les cellules T CD27⁺CD4⁺. De plus, un traitement avec un anticorps anti-CD70 empêchait le développement de la pathologie et diminuait la sévérité de la maladie causée par les cellules CD27⁺CD4⁺ (Manocha et al. 2009). Toutefois, les résultats obtenus lors d'une autre étude réalisée récemment dans un modèle murin de transfert adoptif des maladies inflammatoires de l'intestin et de la maladie du greffon contre l'hôte sont contradictoires. Dans cette étude, le transfert de cellules T CD70^{-/-} menait à une sévérité accrue de la maladie ainsi qu'à une production de cytokines pro-inflammatoires augmentée comparativement aux cellules T de type sauvage. Selon les auteurs, CD70 limiterait donc

l'expansion des cellules T à travers des mécanismes d'apoptose dépendants des caspases ainsi qu'à travers l'augmentation de l'expression de molécules inhibitrices des points de contrôle immunitaire (O'Neill et al. 2017). Ainsi, la voie costimulatrice CD27/CD70 pourrait également avoir un rôle inhibitoire, qui contribuerait à la suppression de la réponse inflammatoire des lymphocytes T.

3.3 La voie CD27/CD70 et la sclérose en plaques

Bien que la voie CD27/CD70 ait été étudiée de manière assez approfondie dans plusieurs maladies inflammatoires auto-immunes, il n'y a que peu d'information connue sur son rôle dans la sclérose en plaques. La contribution de la voie costimulatrice CD27/CD70 a majoritairement été étudiée dans le modèle animal de la SEP, soit l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). L'EAE est une maladie inflammatoire du SNC à médiation cellulaire avec plusieurs caractéristiques cliniques, histopathologiques et immunologiques qui sont très semblables à ce qui est observé chez les patients atteints de la SEP (Fletcher et al. 2010). L'EAE est médiée par des cellules T spécifiques au peptide de la myéline, qui sont activées dans la périphérie puis transmigrent dans le SNC. Ultiment, l'animal développe une paralysie ascendante avec de l'inflammation et de la démyélinisation (Fletcher et al. 2010).

Une des premières expériences effectuées afin d'explorer le rôle de la voie CD27/CD70 dans l'EAE consistait à traiter des souris SJL/J avec un anticorps monoclonal bloquant spécifique à CD70. Le traitement préventif avec cet anticorps empêchait le développement de l'EAE active, mais n'avait pas d'effet lors d'un transfert adoptif d'EAE. L'approche privilégiant le traitement tardif avec ce même anticorps anti-CD70 n'avait pas non plus d'effet sur le développement et la sévérité de l'EAE active. Le traitement avec l'anti-CD70 *in vivo* n'affectait pas la prolifération des lymphocytes T (Nakajima et al. 2000). Francosalinas et al. ont quant à eux montré que la surexpression de CD70 sur les cellules B entraîne une augmentation de la susceptibilité à l'EAE dans un modèle de souris transgénique spécifique pour le peptide MOG 35-55 (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) de la myéline. Cela cause une augmentation du nombre de cellules T autoréactives, sans toutefois affecter leurs capacités effectrices. Ils ont également établi que l'expression constitutive de CD70 sur les cellules B mène à une diminution de la fréquence des cellules T régulatrices FOXP3⁺ (Francosalinas et al. 2013). Une autre étude a montré que la sévérité de l'EAE ainsi que le taux de mortalité sont plus élevés en absence de CD27 et CD70, soit chez des souris CD27^{-/-} et CD70^{-/-}. Des souris exprimant CD70 de manière constitutive sur les cellules dendritiques présentaient quant à elle une diminution de la sévérité des symptômes de l'EAE. Finalement, le signal de costimulation fournie par CD27 affecte la fonction des cellules effectrices T_H17 en réduisant l'expression d'IL-17 et de CCR6 (CCR- C-

C chemokine receptor), mais pas l'expression de ROR γ T (Coquet, Middendorp, et al. 2013; Wang and Dong 2013).

Au niveau de la recherche effectuée chez l'humain, une équipe a montré que la forme soluble de CD27 se trouvait dans le LCR des patients atteints de la SEP et pourrait potentiellement agir à titre de marqueur d'inflammation lors du diagnostic des patients (Komori et al. 2015). Une autre équipe a montré que le CD27 soluble se trouvant dans le LCR des patients atteints du syndrome clinique isolé, soit un premier épisode de démyélinisation, est un bon indicateur du développement de la SEP mais aussi, d'un haut taux de poussée (van der Vuurst de Vries et al. 2017).

Des données obtenues suite à des expériences réalisées dans le laboratoire par Dre Tessa Dhaeze ont été essentielles au développement de ce projet de recherche. Tout d'abord, l'expression de CD70 sur les lymphocytes T CD4⁺ *ex vivo* provenant du sang périphérique de sujets sains et de patients atteints de différentes formes de la SEP a été analysée. L'expression de CD70 est significativement plus élevée sur les lymphocytes T CD4⁺ de patients atteints des différentes formes de la SEP, et d'autant plus lors d'une poussée aiguë, comparativement aux sujets sains et aux sujets atteints d'une autre maladie neurologique. De plus, les cellules T CD4⁺ retrouvées dans le LCR expriment elles aussi de hauts niveaux de CD70. Ainsi, l'augmentation de l'expression de CD70 sur les lymphocytes T *ex vivo* est spécifique aux patients atteints de la SEP.

Ensuite, d'autres expériences réalisées dans le laboratoire ont montré que lorsque les cellules T CD4⁺ de sujets sains sont stimulées *in vitro* pendant cinq jours avec du TGF- β seulement ou en combinaison avec d'autres cytokines, soit l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-23, l'expression de CD70 est augmentée de manière significative comparativement au contrôle stimulé uniquement avec de l' α CD3/ α CD28. De plus, les cellules T CD4⁺ des patients atteints de la RRMS expriment significativement plus de CD70 que les cellules de sujets sains lorsqu'elles sont stimulées *in vitro* avec du TGF- β seulement ou en combinaison avec d'autres cytokines. Le TGF- β est donc clairement une cytokine qui peut entraîner une augmentation de l'expression de CD70 et ce, autant chez les patients atteints de la SEP que chez les sujets sains.

Enfin, il a été montré par Dre Tessa Dhaeze que les cellules de sujets sains polarisées *in vitro* en sous-type T_H1 et T_H17 expriment significativement plus de CD70 que les cellules CD4⁺ mémoire *ex vivo* et que les cellules polarisées en T_H2. De plus, les cellules de patients atteints de la RRMS polarisées *in vitro* en sous-type T_H1 produisant de l'IFN- γ et T_H17 produisant de l'IL-17 expriment significativement plus de CD70 que les cellules de sujets sains. Ainsi, l'expression élevée de CD70 est spécifique aux sous-types de cellules T_H1 et T_H17, qui sont les deux sous-types de lymphocytes T clés impliqués dans le développement de la SEP. Toutefois, rien n'est connu à ce jour au niveau de la transmigration des lymphocytes T CD70⁺ activés à travers la BHE, sur l'expression de CD70 sur les cellules immunitaires se trouvant dans le SNC de patients atteints de la SEP ou encore, sur les voies de signalisation activées dans les lymphocytes T CD70⁺.

Hypothèse et objectifs

Des données obtenues précédemment dans le laboratoire ont montré que la présence de CD70 à la surface des lymphocytes T CD4⁺ est associée non seulement à l'expression de cytokines pro-inflammatoires mais aussi de molécules d'adhésion spécifiques telles MCAM, VLA-4 et LFA-1, jouant toutes un rôle essentiel au niveau de la migration transendothéliale (Larochelle et al. 2012; Larochelle et al. 2015; Ifergan et al. 2011; Bo et al. 1996). L'hypothèse de ce projet de recherche est donc que la voie costimulatrice CD27/CD70 joue un rôle dans la réponse inflammatoire et dans la transmigration des cellules T CD4⁺ à travers la barrière hématoencéphalique dans la sclérose en plaques.

Afin de valider cette hypothèse, 6 objectifs distincts ont été fixés.

1. Caractériser l'expression de CD27 et CD70 sur les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique.
2. Évaluer l'expression de la forme soluble de CD70 dans le liquide céphalo-rachidien et le sérum de patients atteints de la SEP.
3. Évaluer le rôle qu'a l'expression de CD27 et CD70 sur les lymphocytes T polarisés en sous-types T_H1 et T_H17 lors de leur transmigration à travers les CEBHE.
4. Évaluer le rôle qu'a l'expression de CD27 et CD70 sur les lymphocytes T stimulés avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec de l'IL-1β, de l'IL-6 et de l'IL-23 lors de leur transmigration à travers les CEBHE.
5. Déterminer les sous-types de cellules immunitaires exprimant CD27 et CD70 dans les lésions du cerveau de patients atteints de la SEP.
6. Identifier les voies de signalisation intracellulaire activées dans les cellules T CD4⁺CD70⁺.

Matériels et méthodes

1. Isolation et culture de cellules immunitaires humaines

Suite à l'obtention du consentement éclairé de chaque donneur selon les politiques institutionnelles du centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Numéro d'approbation du comité d'éthique du CRCHUM : BH07.001), du sang périphérique de donneur sain a été prélevé par ponction veineuse et les PBMC ont été isolées par gradient de densité en utilisant du Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare).

À partir des PBMC, une sélection positive a été effectuée à l'aide de microbilles magnétiques pour obtenir les cellules T CD4⁺ *ex vivo* (EasySep) et une sélection négative a permis l'isolation de cellules T CD4⁺ mémoire *ex vivo* (CD4RO) (Milteny), selon les instructions fournies par le manufacturier.

Les cellules T CD4⁺ ont été cultivées *in vitro* comme suit : pour l'activation non-spécifique, 0,5x10⁶ cellules ont été cultivées dans des plaques 24 puits couvertes d'anti-CD3 (2,5 µg/mL OKT3; Ebioscience), avec de l'anti-CD28 soluble (2,0 µg/mL; BD Biosciences), dans du milieu X-vivo 15 (Lonza) supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine (provenant toutes de Sigma). L'induction de l'expression de CD70 a été réalisée par l'ajout de différentes cytokines aux cellules T CD4⁺ pendant 5 jours avec les cytokines suivant : du TGF-β (3 ng/mL) uniquement ou en combinaison avec du rhIL-1β(10 ng/mL), du rhIL-6 (20 ng/mL) et du rhIL-23 (25 ng/mL)(toutes les cytokines proviennent de R&D Systems). Lors de l'expérience de signalisation cellulaire, les cellules ont exceptionnellement été incubées pendant une période de 7 jours et 8 ng/mL de CD27 soluble (Abcam; ab114342) ont été ajoutés dans certains puits déterminés préalablement au jour 4, 5 et 6.

Pour la polarisation en cellules T helper, les cellules T CD4RO ont été cultivées *in vitro* comme suit : pour l'activation non spécifique, 1x10⁶ cellules ont été cultivées sur des plaques 6 puits couverts d'anti-CD3 (0.5 µg/mL OKT3, Ebioscience), avec de l'anti-CD28 soluble (1.0 µg/mL;

BD Biosciences), dans du milieu X-vivo 15 (Lonza) supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine (provenant toutes de Sigma). Pour la différenciation en T_H1, du rhIL-12 (10 ng/ml; R&D Systems) et de l'anti-hIL-4 (5 µg/ml; BioXCell) ont été ajoutés alors que du rhIL-23 (25 ng/ml; R&D Systems), de l'anti-hIL-4 (5 µg/ml; BioXCell) et de l'antiIFN-γ (5 µg/ml; BioXCell) ont été ajoutés pour la différenciation en T_H17 et les cellules ont été incubées pendant 6 jours. Après la culture *in vitro*, la présence de différents marqueurs et la capacité des cellules à produire des cytokines ont été évaluées par cytométrie en flux et par qPCR.

2. Isolation et cultures de cellules endothéliales de la BHE humaine

Suite à l'obtention du consentement éclairé de chaque donneur avant la chirurgie (Numéro d'approbation du comité d'éthique du CRCHUM : BH07.001), les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique ont été isolées à partir de matériel non-épileptique, selon un protocole déjà décrit (Prat et al. 2000; Prat et al. 2002). Les CEBHE ont été cultivées jusqu'à confluence dans du milieu composé du Medium 199 (Invitrogen) enrichi avec 20% de milieu conditionné par les cellules d'un mélanome murin (clone M3, ATCC), 10% de sérum bovin fœtal (SBF ; Gibco), 5% de sérum humain (SH ; Gibco), 0,2% de supplément de croissance pour les CE (ECGS - *endothelial cell growth supplement* ; BD Biosciences) et 0,13% d'insulin-selenium-transferrin premix (Sigma) dans des flasques de culture couvertes avec 0,5% de gélatine (Sigma). Les CEBHE ont ensuite été activées par du milieu de culture supplémenté par 40% de milieu conditionné par les astrocytes (MCA) ou par l'ajout de 200 U/ml de TNF et 100 U/ml d'IFN-γ (Invitrogen) pendant 24 heures. Des CEBHE non-activées, ayant été cultivées dans du milieu de culture non-activé ont été utilisées comme contrôle. Les CEBHE ont par la suite été lavées avec du tampon phosphate salin (PBS - *Phosphate buffered saline*) puis incubées 5 minutes à 37°C suivi de 5 minutes à température ambiante avec du PBS supplémenté avec de l'éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA ; 2mM ; Sigma). Ensuite, les cellules ont été incubées avec de la trypsine (Gibco) pendant une minute à 37°C puis, suite à leur détachement de la flasque de culture, elles ont été récoltées et analysées par cytométrie en flux, western blot et qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*).

3. Marquages par la cytométrie en flux

3.1 Marquage intracellulaire des cytokines

Avant de débiter le marquage par cytométrie en flux, les cellules ont été activées à 37°C pendant 4 heures avec 1 µg/mL de ionomycine (Sigma), 20 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA ; Sigma) et 2 µg/mL de l'inhibiteur de transport protéique Golgi PlugTM (BD Biosciences). Par la suite, les cellules ont été resuspendues dans du PBS puis le marquage extracellulaire des lymphocytes T ou des CEBHE a été effectué pendant 30 minutes à 4°C avec les anticorps anti-humain suivant : CD3 (Biolegend), CD4 (Ebioscience), CD27 (BD Biosciences), CD31 (R&D Systems), CD54 (BD Biosciences), CD106 (BD Biosciences), CD166 (BD Biosciences), CD70 (BD Biosciences), et CD146 (BD Biosciences ou Miltenyi Biotec) ou avec les contrôles isotypiques adéquats. Une fois les étapes de fixation/perméabilisation (30 minutes à 4°C) et de lavage effectuées avec le kit Cytofix/CytopermTM Plus (BD Biosciences), les cellules ont été marquées pendant 30 minutes à 4°C, avec les anticorps suivants : IL-10 (Biolegend), GM-CSF (BD Biosciences), IFN-γ (BD Biosciences) et IL-17 (Ebioscience) ou avec les contrôles isotypiques appropriés. L'acquisition a été réalisée avec un appareil de cytométrie en flux BD LSR II, à l'aide du logiciel BD FACS Diva (BD Biosciences).

3.2 Marquage intracellulaire des facteurs de transcription

Les cellules ont été resuspendues dans du tampon de cytométrie en flux composé de PBS supplémenté avec 1% de SBF et 0,1% de NaN₃ (Fisher Scientific). Le marquage extracellulaire des lymphocytes T a été effectué pendant 30 minutes à 4°C avec les anticorps anti-humain suivant : CD3 (Biolegend), CD4 (Ebioscience) et CD70 (BD Biosciences) ou avec les contrôles isotypiques adéquats. Pour le marquage intracellulaire des facteurs de transcriptions (kit eBioscienceTM Foxp3/Transcription), les anticorps utilisés ont été FOXP3, GATA3, RORγT et Tbet, ou leurs contrôles isotypiques, provenant tous de Ebioscience. Après optimisation, il a été déterminé qu'afin d'obtenir le meilleur marquage possible, l'étape de fixation doit durer 1 h à 4°C pour FOXP3 et un maximum de 18 heures à 4°C pour les autres facteurs de transcription. Également, le marquage intracellulaire de FOXP3 a été effectué pendant 1 heure à 4°C alors que celui des autres facteurs de transcription a été fait 30 minutes à température ambiante.

L'acquisition a été réalisée avec un appareil de cytométrie en flux BD LSR II, à l'aide du logiciel BD FACS Diva (BD Biosciences).

4. Essai de transmigration

Les essais de transmigration ont été réalisés avec des cellules T différenciées en T_{H1} et T_{H17} ou stimulées avec du TGF- β et d'autres cytokines, tel que décrit ci-haut. Aucune chimiokine n'a été utilisée lors de l'essai de transmigration. Des chambres de Boyden modifiées (Thermo Fisher Scientific) ayant des pores de 3 μm ont été couvertes de 0,5% de gélatine et ont été utilisées pour mettre en culture 3×10^4 CEBHE pendant 3 jours, jusqu'à l'obtention d'une monocouche confluente. La mise en culture a été réalisée dans du milieu de culture supplémenté par 40% MCA. 1×10^6 cellules T ont ensuite été placées sur la chambre du haut (en triplicata pour chacune des conditions étudiées), puis l'essai a été incubé pendant 18 heures. Ensuite, les cellules ayant migré à travers les CEBHE et celles se trouvant dans la chambre du haut ont été récupérées séparément et comptées avant d'être analysées par cytométrie en flux. Pour les essais de transmigration effectués avec les cellules T_{H1} et T_{H17} , lorsqu'il est indiqué, les cellules T ont été incubées pendant 1 heure avec un anticorps spécifique bloquant CD70 (40 $\mu\text{g/mL}$; Abcam; ab77868) ou le contrôle isotypique approprié avant d'être placées sur les chambres de Boyden.

5. Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Des cellules T $CD4^+$ activées ainsi que des CEBHE ont été analysées par qPCR. À partir de culot $< 5 \times 10^6$ cellules conservées à -80°C , l'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen), selon les instructions fournies par le fabricant. La quantité d'ARN présente dans chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un nanophotomètre (Implen) puis 0,5 μg d'ARN a été transcrit en ADNc à l'aide du kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen), selon les instructions du fabricant. La transcription en ADNc a été effectuée dans un Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) selon le protocole suivant : 2 minutes à 42°C dans le gDNA Wipeout Buffer (RNeasy® Mini Kit - Qiagen) afin d'enlever l'ADN génomique suivi de la transcription inverse, soit 30 minutes à 42°C puis 3 minutes à 95°C . Les niveaux relatifs d'expression génique ont pu être déterminés à l'aide d'amorces et des sondes de

polarisation TaqMan MGB marquées avec le rapporteur FAM pour CD70, CD27, FOXP3, GATA3, ROR γ T, Tbet, NF κ B, STAT3, STAT5, Eomesodermin, ERK, AKT, Smad3 et marquée avec le rapporteur VIC pour le 18S ribosomal (tous proviennent de Thermo Fisher Scientific). Toutes les amorces ont la même température d'appariement. Le qPCR a été réalisé dans un QuantStudioTM 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) selon le protocole suivant : 2 minutes à 50°C puis 10 minutes à 95°C suivi par 40 cycles de 15 secondes à 95°C pour la dénaturation et 1 min à 60°C pour les étapes d'appariement et d'élongation. La taille de la séquence à amplifier ainsi que l'utilisation d'amorces TaqMan permet de combiner les étapes d'appariement et d'élongation. La quantité d'ARN messager spécifique au gène d'intérêt a été normalisée en la comparant au 18s ribosomal, qui agit comme contrôle endogène. Lors de l'expérience de signalisation, les résultats sont montrés sous forme de ratio, soit lorsque 8 ng de CD27 soluble est ajouté comparativement à 0 ng.

6. Immunobuvardage

Des cellules T CD4⁺ ex vivo et différenciées en sous-types T_H ainsi que des CEBHE de cultures primaires humaines ont été analysées par immunobuvardage. Le tampon dénaturant Pierce RIPA (Thermoscientific) contenant un inhibiteur de protéinases (1 : 100 ; Thermoscientific) a été utilisé pour lyser les cellules. Ensuite, à l'aide du kit PierceTM BCA Protein (Thermofisher), la concentration protéique a été quantifiée par dosage colorimétrique suivant les instructions fournies par le manufacturier. Les protéines (15 μ g/mL des lymphocytes T et 50 μ g/mL des CEBHE) ont été bouillies 5 minutes à 95°C dans le tampon de chargement afin de les dénaturer puis séparées par électrophorèse sur un gel de SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) de 12% pendant 2 heures. Les protéines ont ensuite été transférées vers une membrane Immun-BlotTM de Polyvinykudene fluoride (PVDF ; Biorad). Les membranes ont été bloquées avec 5% de lait en poudre sans gras, dilué dans du Tris-buffered saline (TBS) avec 0,1% de Tween 20 (Sigma) pendant 45 minutes. La membrane a été incubée sur un agitateur à 4°C pendant 16 heures avec l'anticorps primaire polyclonal lapin anti-CD70 (1 : 1000 ; Abcam), avec l'anticorps primaire monoclonal souris anti-CD27(1 : 750 ; Abcam) ou avec le contrôle interne de chargement, l'anticorps murin anti- β -actin (1:20 000; Sigma). La membrane a par la suite été incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire soit la peroxydase

conjuguée chèvre anti-lapin IgG (goat anti-rabbit IgG) (H+L) (1 :10 000 ; Jackson ImmunoResearch) ou la peroxidase conjuguée lapin anti-souris (rabbit anti-mouse IgG) (1 :1000 ; DAKO). Afin de détecter la liaison spécifique des anticorps, l'agent luminescent Western Lightning™ Plus-ECL (PerkinElmer) a été utilisé et la membrane lut à l'aide d'un ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad).

7. Colorations histologiques et immunohistofluorescence de tissu du SNC humain

L'approbation éthique a été obtenue par le Comité scientifique et éthique du centre de recherche du CHUM (Numéro d'approbation : BH07.001) pour l'utilisation de cerveau humain obtenue suite à l'autopsie de patients atteints de SEP. Des sections de tissus ont été sélectionnées pour la présence de lésions actives avec de la démyélinisation ainsi qu'une infiltration périvasculaire de cellules mononucléaires (3 donneurs différents ; 3 blocs par donneur) et ont été comparées à la matière blanche d'apparence normale des mêmes patients. L'âge moyen des patients était de 40 ans ± 8 ans et la durée de la SEP était de 6 à 8 ans.

7.1 Coloration au Luxol-Fast blue et à l'hématoxyline & l'éosine

Cette coloration a été utilisée afin de déterminer l'ampleur de la démyélinisation ainsi que l'importance de l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC des patients. Le tissu humain a été coupé au cryostat à une épaisseur de 7µm. Les coupes ont été récoltées et montées sur des lames Superfrost (Thermo Scientific). Les sections ont été fixées pendant 3 heures dans 10% de formaldéhyde (Fisher Scientific) à température ambiante puis lavées pendant 3 minutes dans du PBS. Les sections ont été colorées au Luxol Fast Blue (1% Solvan Blue 38 (Sigma), 95% éthanol et 0,05% d'acide acétique glaciale (Fisher Scientific)) pendant 3 heures à 60°C. Les sections ont ensuite été placées 1 minute dans l'éthanol 95% puis trempées brièvement dans le différentiateur de Luxol (Solution aqueuse : 0,4% hydroquinone (Sigma) + 5% sulfite de sodium (Sigma)). Les sections ont par la suite été placées dans l'hématoxyline d'Harris (Sigma) pour coloration nucléaire pendant 5 minutes puis différenciées en les trempant brièvement dans le différentiateur d'hématoxyline (1% acide chlorhydrique dans une solution de 70% d'éthanol). Les sections ont été bleuées en utilisant du NaOH 0,05% puis déshydratées avec de l'éthanol

95% pendant 1 minute. Le cytoplasme a été coloré par l'éosine Y pendant 30 secondes puis les sections ont été plongées dans des bains successifs d'éthanol 95% et 100% suivi d'une dernière immersion dans le toluène (Chaptec). Les lamelles ont ensuite été placées sur les lames à l'aide d'Entellan (Millipore). Les images ont été effectuées à l'aide du microscope Leica DM4000B (Leica Microsystems) et du programme Leica Application suite V3 (Leica Microsystems).

7.2 Immunohistofluorescence

Le tissu humain a été coupé au cryostat à une épaisseur de 7 μ m et les coupes ont été récoltées et montées sur des lames Superfrost (Thermo Scientific). Les sections ont été incubées 10 minutes dans de l'acétone 100% puis 5 minutes dans de l'éthanol 70% à -20°C avant d'être placée dans du PBS pour 3 minutes puis 3 autres minutes dans du PBS avec 0,05% Tween 20 (PBST) à température ambiante. Les sections ont ensuite été bloquées pendant 30 minutes à température ambiante avec du sérum d'âne 10% pour empêcher la liaison non spécifique des immunoglobulines. Les sections ont été incubées pendant la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivant dilués dans 3% de sérum d'âne : CD70 souris anti-humain (1/40 ; Abcam), CD27 souris anti-humain (1/60 ; Abcam), CD4 lapin anti-humain (1/30 ; Abcam), CD8 lapin anti-humain (1/100 ; Vector Laboratories), CD11c lapin anti-humain (1/100 ; Abcam) et CD20 lapin anti-humain (1/200, Abcam). Les sections ont été lavées 7 fois 3 minutes avec du PBST à TA. Les sections ont par la suite été incubées 45 minutes à température ambiante avec les anticorps secondaires suivant : âne anti-souris conjugué à l'Alexa Fluor 488 (1/300 ; Jackson ImmunoResearch) et âne anti-lapin conjugué à la cyanine 3 (1/400 ; Jackson ImmunoResearch). Les sections ont ensuite été lavées 3 fois 3 minutes avec du PBST à température ambiante puis 10 minutes avec du PBS avec 1% Triton avant d'être à nouveau lavées 3 fois 3 minutes avec du PBST. Des contrôles négatifs ont été effectués en omettant les anticorps primaires et des contrôles isotypiques ont été effectués en utilisant les anticorps primaires suivants : souris IgG1 (1/20 ; R&D Systems) et lapin IgG (1/200 ; Abcam) en combinaison avec les anticorps secondaires mentionnés ci-haut. Du Gelvatol contenant du TO-PRO 3 (1/300 ; Invitrogen) a été utilisé comme milieu de montage ainsi que pour la coloration nucléaire. Des lamelles ont été placées sur les lames puis l'acquisition de la fluorescence a été réalisée avec un microscope confocal Leica SP5 (Leica Microsystems) et le logiciel Leica Application Suite Advanced Fluorescence (Leica Microsystems).

8. ELISA

Un ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) a été effectué sur du sérum, du LCR, du surnageant de CEBHE et sur des cellules T stimulées. Suite à l'obtention du consentement éclairé de chaque donneur selon les politiques institutionnelles du centre de recherche du CRCHUM (Numéro d'approbation du comité d'éthique : BH07.001) une ponction lombaire effectuée dans un cadre clinique a permis d'obtenir du LCR de patients atteints de la SEP ou d'autres maladies neurologiques. Après centrifugation, le surnageant a été recueilli et conservé à -80°C. Ensuite, la concentration de CD70 soluble présente dans différents échantillons provenant de patients et de sujets sains a été évaluée à l'aide du kit CD27L/CD70 humain (LSBio), selon les instructions fournies par le manufacturier. Lors de la sélection des échantillons de sérum et de LCR, les patients ont été classifiés comme étant atteints de la SEP cyclique (RRMS; n=26), de la SEP progressive (PMS; n=4), d'autres maladies neurologiques (OND; n=12) ou comme étant des sujets sains (HC; n=5) par deux neurologistes certifiés, en suivant les critères McDonald révisés (Thompson et al. 2018). Les autres maladies neurologiques incluses comprennent entre autres le syndrome de fatigue chronique, la neurosyphilis, la névralgie du trijumeau, l'encéphalopathie hypertensive, la névrite optique isolée, l'athérosclérose ou encore le glioblastome.

9. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad PRISM 6.0. Les données sont présentées sous forme de nombre absolu ou de moyenne \pm l'erreur type de la moyenne. Le test t de Student non-pairé a été utilisé dans le cadre de l'ELISA et le test t de Student pairé a été utilisé dans tous les autres cas. Seules les valeurs P (P values) $< 0,05$ ont été interprétées comme étant significatives.

Résultats

L'implication de la voie costimulatrice CD27/CD70 a été étudiée dans diverses maladies auto-immunes, mais très peu de données sont disponibles quant à son rôle potentiel dans la sclérose en plaques. Tel que mentionné précédemment, des données obtenues dans le laboratoire ont montré que l'expression de CD70 est plus élevée sur les cellules T CD4⁺ de patients atteints des différentes formes de la SEP comparativement aux sujets sains. L'expression de CD70 sur les lymphocytes T CD4⁺ est également augmentée en présence de certaines cytokines, particulièrement le TGF- β . Finalement, l'expression de CD70 est plus élevée sur les cellules polarisées en sous-type T_H1 et T_H17 comparativement aux cellules non-polarisées ou au T_H2. Ainsi, le but de ce projet est d'étudier davantage le rôle de la voie CD27/CD70 dans la SEP, plus spécifiquement au niveau de la transmigration lymphocytaire à travers la BHE, de l'expression sur les cellules endothéliales de la BHE et dans le cerveau de patients atteints de la SEP et des voies de signalisation intracellulaires des cellules CD4⁺CD70⁺.

1. CD70 est exprimé sur les CEBHE et son expression est augmentée en condition de culture pro-inflammatoire.

Les ligands de la famille des TNF tel que CD70 peuvent être exprimés sur les cellules endothéliales (Seko et al. 2002). L'expression de CD27 et CD70 n'a cependant pas été étudiée sur les cellules endothéliales de la BHE. Ainsi, afin de déterminer si CD27 et CD70 étaient exprimés par ces cellules, leur expression a été évaluée par cytométrie en flux, qPCR et immunobuvardage (Figures 6-9). Il est tout d'abord possible de voir par l'analyse du qPCR que chez l'humain, CD70 est exprimé sur les cellules endothéliales de la BHE, mais pas sur les cellules méningées de la BHE (CMBHE) ou sur les astrocytes (figure 6). Ensuite, il est possible de constater que l'expression de CD70 est augmentée sur les CEBHE en présence d'IFN- γ et de TNF- α comparativement au milieu de culture contrôle (figure 7). En effet, les résultats obtenus par qPCR montrent que l'expression relative de CD70 sur les CEBHE est significativement plus élevée lorsque de l'IFN- γ et du TNF- α sont présents dans le milieu de culture comparativement aux conditions de culture contrôle (figure 7A). Cette observation effectuée au niveau de l'ARN messager est ensuite confirmée au niveau protéique par cytométrie en flux et subséquentement, par immunobuvardage. Ainsi, selon les données de cytométrie en flux, environ 5% des CEBHE

cultivées en présence des cytokines IFN- γ et TNF- α expriment CD70, ce qui est significativement plus élevé que les niveaux observés en condition de culture contrôle ou encore en présence de 40% de MCA (figure 7B). Par la suite, un immunobuvardage a été effectué afin d'évaluer l'expression protéique de CD70 sur des CEBHE cultivées dans différents milieux de culture (figure 8). Tout d'abord, il est possible de voir que les lymphocytes T *ex vivo* expriment à la fois la forme monomérique inactive de CD70 à 21 kDa ainsi que la forme trimérique active à 63 kDa. Au niveau des cellules polarisées en T_H1, qui agissent à titre de contrôle positif, seule la forme trimérique active est observée. Les CEBHE expriment elles aussi uniquement la forme trimérique active de CD70. Toutefois, il est possible de voir que l'expression de CD70 est nettement augmentée sur les CEBHE cultivées en présence d'IFN- γ et de TNF- α comparativement aux CEBHE non activées. CD70 est donc clairement exprimé sur les CEBHE et ce, significativement plus en condition de culture pro-inflammatoire comparativement aux conditions de culture contrôle. Il est toutefois intéressant de noter que CD27 n'a pas pu être observé sur les CEBHE et ce, autant au niveau de l'ARN messager ou protéique, peu importe les conditions de culture (données non incluses). En effet, un immunobuvardage permet de constater que CD27 est bien exprimé par les lymphocytes T, mais pas par les CEBHE (figure 9).

Un ELISA a été effectué afin d'évaluer la présence de la forme soluble de CD70 sécrétée par les CEBHE (figure 10). Ainsi, environ 1 ng/mL de CD70 soluble a pu être mesuré dans le surnageant des CEBHE provenant de patients contrôles, soit atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) que la SEP. Toutefois, la quantité de CD70 soluble mesurée est plus élevée pour les CEBHE provenant de patients atteints de la SEP comparativement aux contrôles. Finalement, un autre ELISA a été effectué afin de déterminer si la forme soluble de CD70 peut être détectée dans le sérum ou dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de la SEP (figure 11). Il est possible de constater que cette forme est présente uniquement dans le LCR et pas dans le sérum des patients atteints de la SEP ou d'autres maladies neurologiques. La concentration de CD70 soluble est aussi plus élevée dans le LCR des patients atteints de la forme cyclique comparativement à la forme progressive ou bien aux patients contrôles étant atteints d'autres maladies neurologiques.

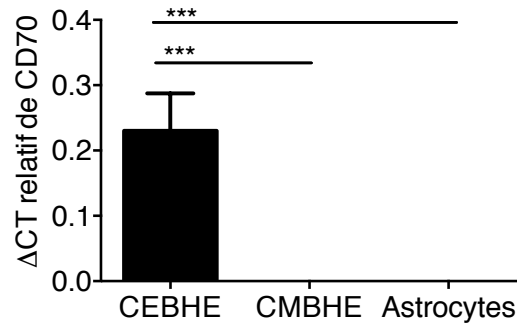


Figure 6. CD70 est exprimé sur les CEBHE, mais pas sur les CMBHE ou les astrocytes provenant de tissu cérébral sain.

Expression relative de CD70 mesurée par qRT-PCR sur les CEBHE (n=4), CMBHE (n=1) et les astrocytes provenant de tissu cérébral sain (n=4). Un test t de Student pairé a été utilisé, *** p<0,001.

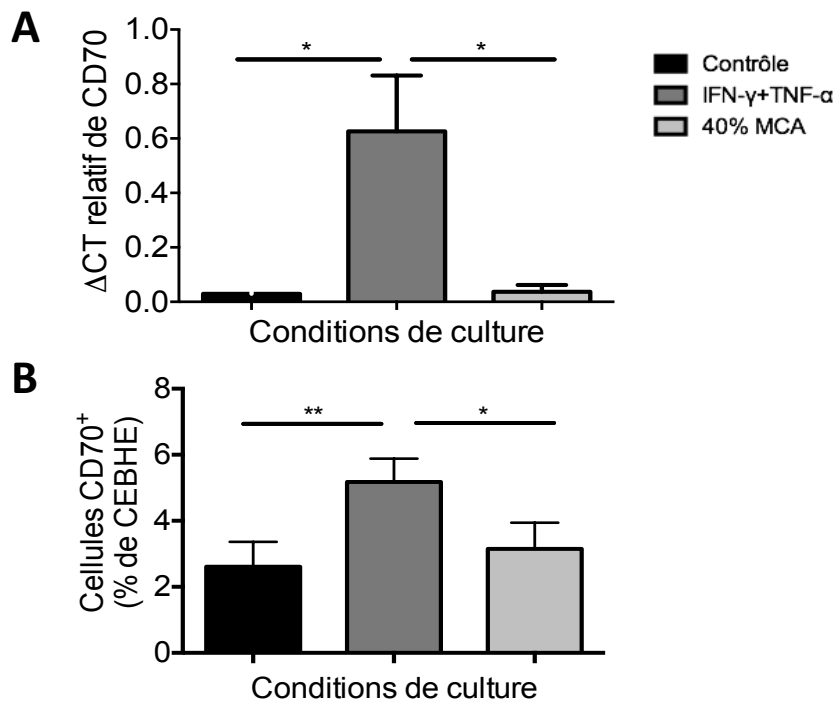


Figure 7. L'expression de CD70 sur les CEBHE est augmentée en condition de culture pro-inflammatoire.

Expression de CD70 (A) au niveau de l'ARNm, mesurée par qRT-PCR (B) au niveau protéique, mesurée par cytométrie en flux, sur les CEBHE provenant de tissu cérébral sain cultivées en condition contrôle (n=9), en présence d'IFN-γ et de TNF-α (n=9) ou de 40% MCA (n=8). Un test t de Student pairé a été utilisé, * p<0,05; ** p<0,01.

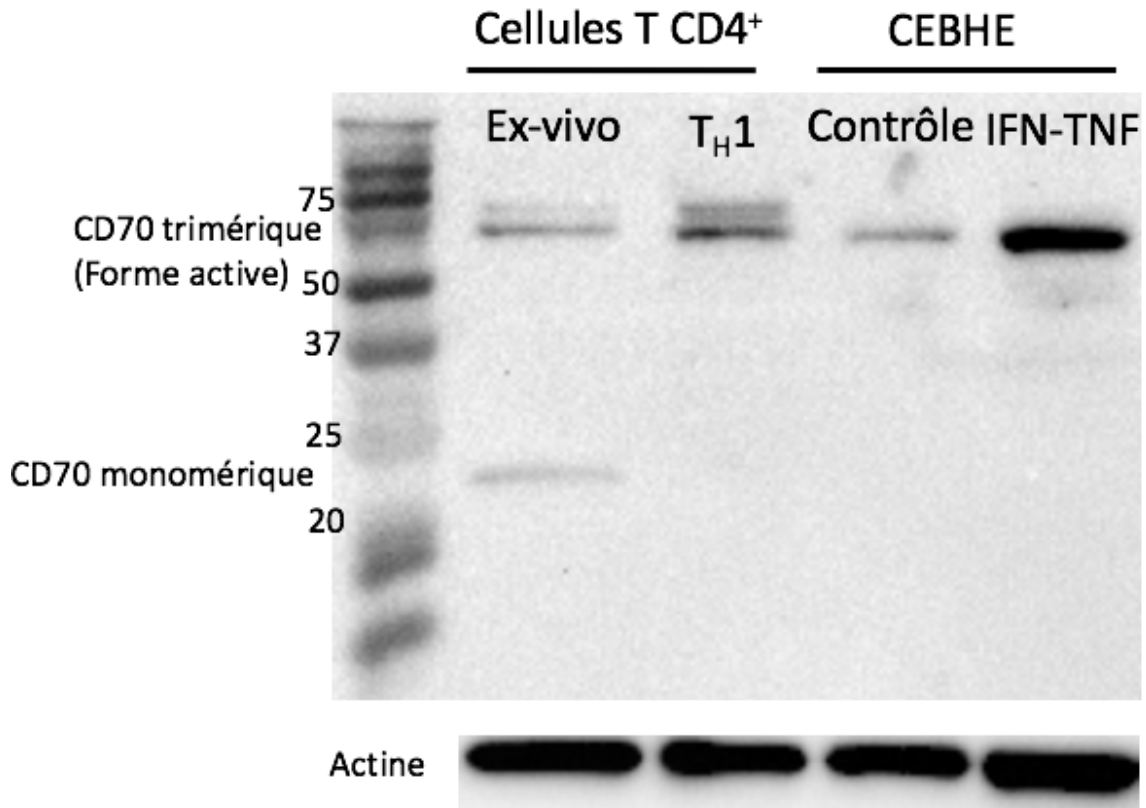


Figure 8. La forme trimérique active de CD70 est présente en condition inflammatoire.

Immunobuvardage de CD70 montrant la forme monomérique inactive de CD70 et la forme trimérique active sur des cellules T CD4⁺ *ex vivo*, des cellules différenciées en TH1 ou des CEBHE provenant de tissu cérébral sain cultivées en condition contrôle ou en présence de d'IFN- γ et de TNF- α (représentatif de n=5).

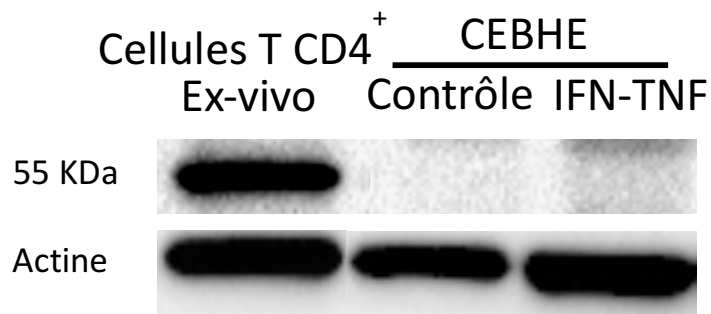


Figure 9. La forme monomérique de CD27 n'est pas exprimée sur les CEBHE.

Immunobuvardage de CD27 montrant l'expression de la forme monomérique de CD27 sur les cellules T *ex vivo* et les CEBHE provenant de tissu cérébral sain cultivées en condition contrôle ou en présence de d'IFN- γ et de TNF- α . (représentatif de n=5).

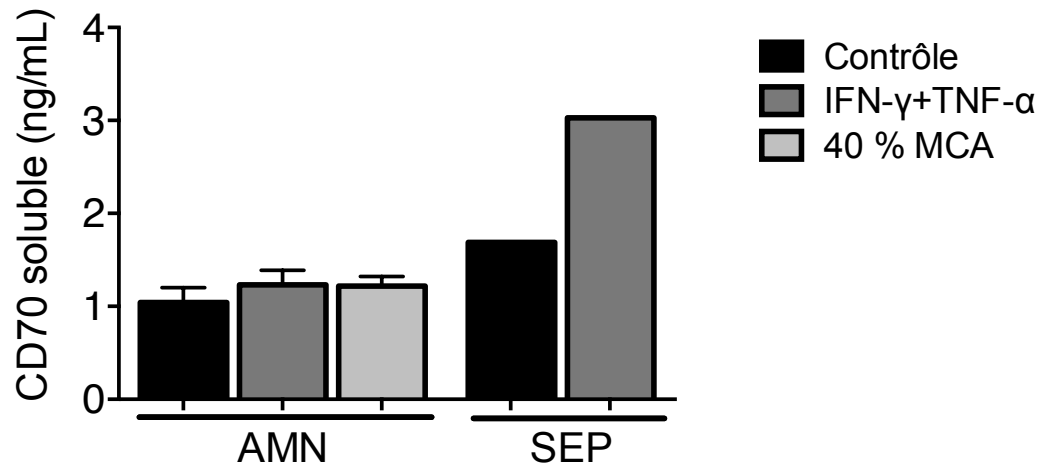


Figure 10. La forme soluble de CD70 est présente dans le surnageant des CEBHE.

Concentration de CD70 soluble sécrétée *in vitro* par les CEBHE de patients atteints de la SEP (n=1) ou d'autres maladies neurologiques (AMN) (n=5), en conditions de culture contrôle ou en présence d'IFN-γ et de TNF-α ou de 40% MCA.

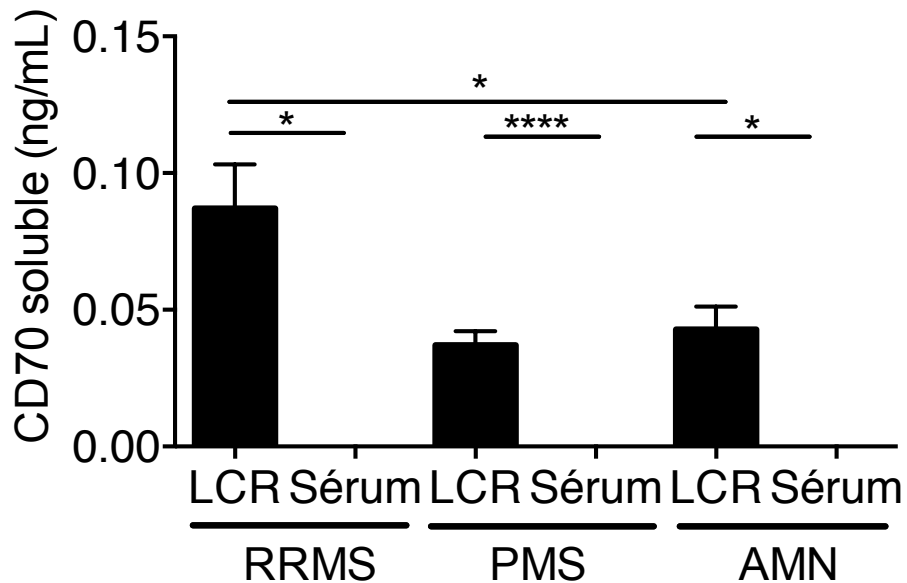


Figure 11. La forme soluble de CD70 est présente dans le LCR, mais pas dans le sérum de patients atteints de la SEP.

Concentration de CD70 soluble dans le LCR et le sérum de patients non traités atteints de la forme RRMS (n=27), PMS (n=4) et d'autres maladies neurologiques (AMN) (n=12). Un test t de Student non-pairé a été utilisé, * p<0,05 ; **** p<0,0001.

2. Les cellules T_H $CD70^+$ présentent un profil inflammatoire après leur migration à travers les CEBHE

Le modèle *in vitro* de la BHE consiste à utiliser des chambres de Boyden modifiées afin de réaliser des études fonctionnelles de la barrière hématoencéphalique. Dans les essais de transmigration réalisés, différentes populations de lymphocytes T sont ajoutées pendant 18 heures sur une monocouche de CEBHE confluentes. Les cellules ayant migré à travers les CEBHE et celles se trouvant dans la chambre du haut sont ensuite récupérées séparément et comptées avant d'être analysées par cytométrie en flux. Des cellules ont donc été polarisées en sous-types T_H1 et T_H17 puis incubées pendant une heure avec un anticorps spécifique bloquant ou le contrôle isotypique approprié avant d'être placées sur les chambres de Boyden modifiées. Il est tout d'abord possible de constater qu'il n'y a pas de différence dans le nombre absolu de cellules ayant migré à travers les CEBHE lorsque les cellules ont été incubées avec l'anticorps bloquant anti- $CD70$ ou l'isotype et ce, autant pour les sous-types T_H1 que T_H17 (figure 12). Ainsi, le fait de bloquer $CD70$ n'a pas d'effet sur la migration des cellules à travers la BHE. De plus, l'ajout de l'anticorps bloquant anti- $CD70$ n'a pas d'effet sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules ayant migré à travers les CEBHE (figure 13).

Au niveau des cellules ayant été incubées avec le contrôle isotypique, il est possible de voir que le nombre absolu de cellules $CD70^+$ ayant migré à travers les CEBHE est significativement plus élevé pour les cellules polarisées en T_H17 que pour les cellules polarisées en T_H1 tel que décrit précédemment par notre laboratoire (Kebir et al. 2007) (figure 14). Également, le nombre absolu de cellules $IL-17^+IFN-\gamma^+$ qui exprime $CD70$ ayant migré est significativement plus élevé sur les cellules polarisées en T_H17 comparativement aux cellules polarisées en T_H1 (figure 15). Lorsqu'on observe le pourcentage de cellules $GM-CSF^+IL-17^+$ ayant migré à travers les CEBHE (figure 16), il est possible de constater que ce pourcentage est significativement plus élevé pour les cellules $CD70^+$ comparativement aux cellules $CD70^-$ et ce, autant pour les cellules polarisées en T_H1 que pour les cellules polarisées en T_H17 . Toutefois, le pourcentage de cellules $CD70^+GM-CSF^+IL-17^+$ ayant migré à travers les CEBHE est significativement plus élevé sur les cellules T_H17 que sur les cellules T_H1 . Finalement, le pourcentage de cellules $CD27^+$ est équivalent pour les cellules ayant migré ou non à travers les CEBHE, et ce, autant au niveau des cellules polarisées en T_H1 que celles polarisées en T_H17 (figure 17).

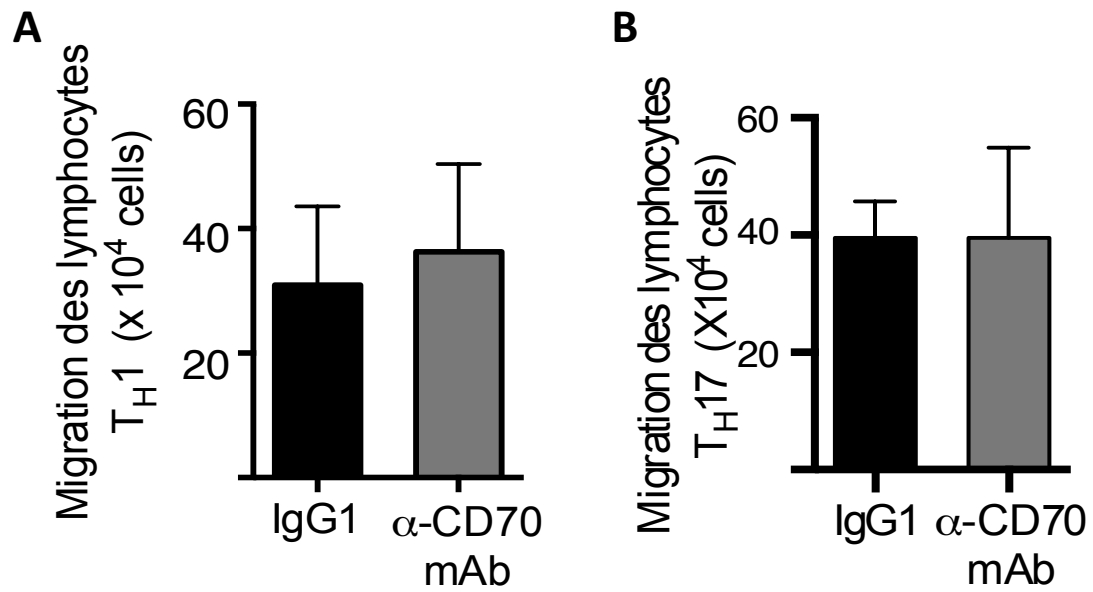


Figure 12. L'anticorps bloquant anti-CD70 n'a pas d'effet sur la migration des cellules polarisées en T_H1 et T_H17 à travers les CEBHE.

Migration de cellules polarisées en sous-types (A) T_H1 et (B) T_H17 à travers les CEBHE, suite à leur traitement avec un anticorps anti-CD70 ou avec un contrôle isotypique (n=5 sujets sains).

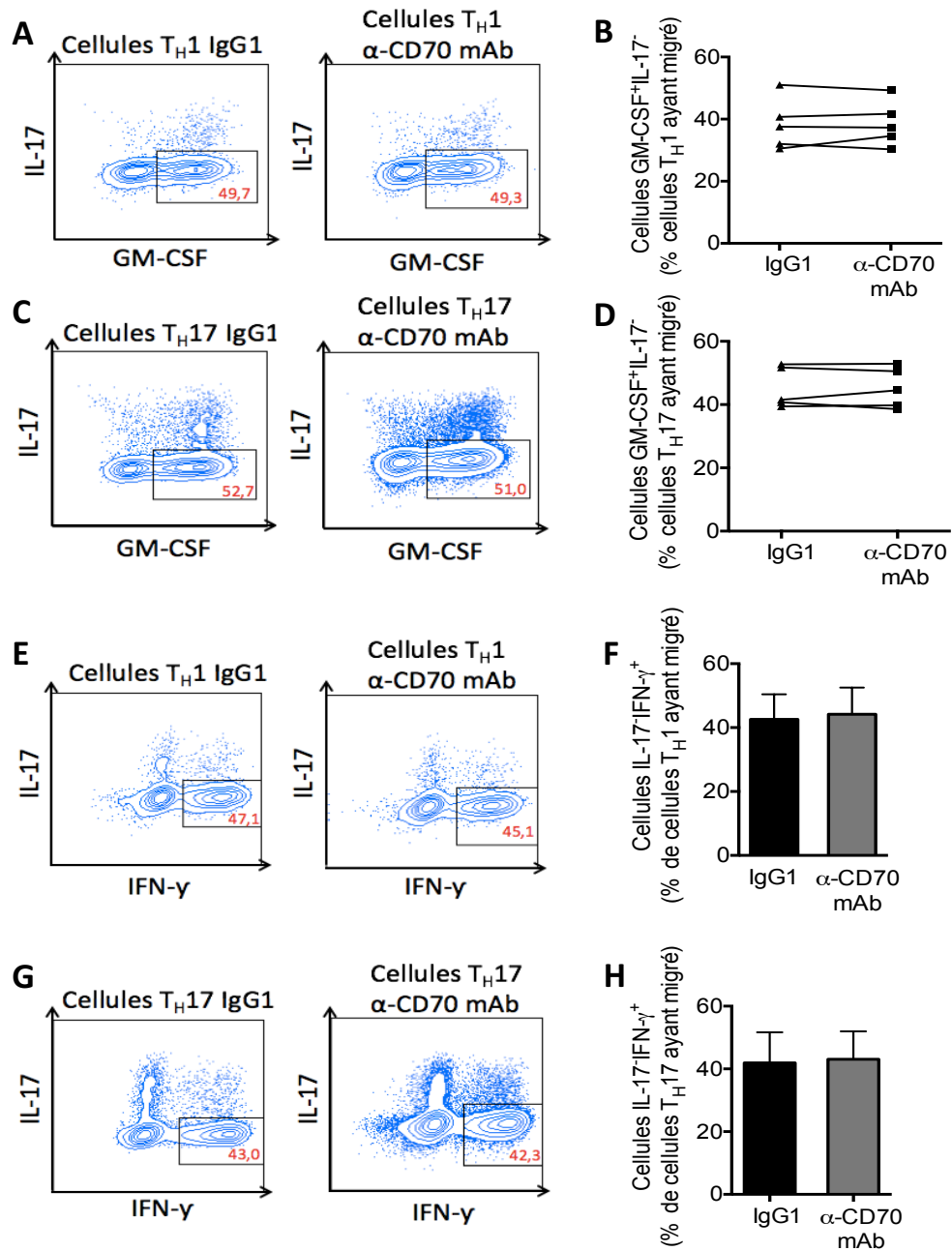


Figure 13. L'anticorps bloquant anti-CD70 n'a pas d'effet sur la production de cytokines par les cellules T_H1 et T_H17 ayant migré à travers les CEBHE.

Nuages de points représentatifs obtenus par cytométrie en flux et pourcentage de cellules (A à D) GM-CSF⁺IL-17⁺ et (E à H) IL-17⁺IFN- γ ⁺ des cellules polarisées en sous-types T_H1 et T_H17 ayant migré à travers les CEBHE, suite à leur traitement avec un anticorps anti-CD70 ou avec un contrôle isotypique (n=5 sujets sains). Le marquage intracellulaire des cytokines par cytométrie en flux a été effectué après une incubation de 4h à 37°C en présence de PMA, ionomycine et Golgi Plug.

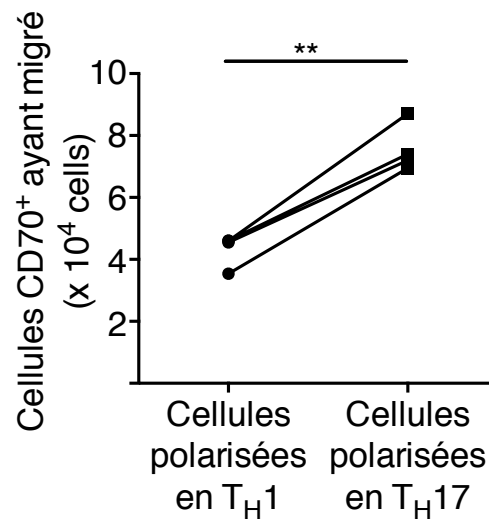


Figure 14. Les cellules CD70⁺ polarisées en TH17 sont plus nombreuses à avoir migré à travers les CEBHE que les cellules CD70⁺ polarisées en TH1.

Nombre absolu de cellules CD70⁺ polarisées en TH1 et TH17 ayant migré à travers les CEBHE (n=4 sujets sains). Un test t de Student païré a été utilisé, ** p<0,01.

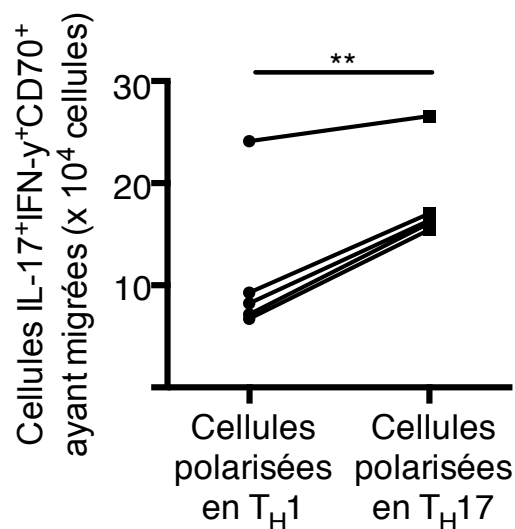


Figure 15. Les cellules IL-17⁺IFN- γ ⁺CD70⁺ polarisées en TH17 sont plus nombreuses à avoir migré à travers les CEBHE que les cellules IL-17⁺IFN- γ ⁺CD70⁺ polarisées en TH1.

Nombre absolu de cellules IL-17⁺IFN- γ ⁺CD70⁺ polarisées en TH1 et TH17 ayant migré à travers les CEBHE (n=5 sujets sains). Le marquage intracellulaire des cytokines par cytométrie en flux a été effectué après une incubation de 4h à 37°C en présence de PMA, ionomycine et Golgi Plug. Un test t de Student païré a été utilisé, ** p<0,01.

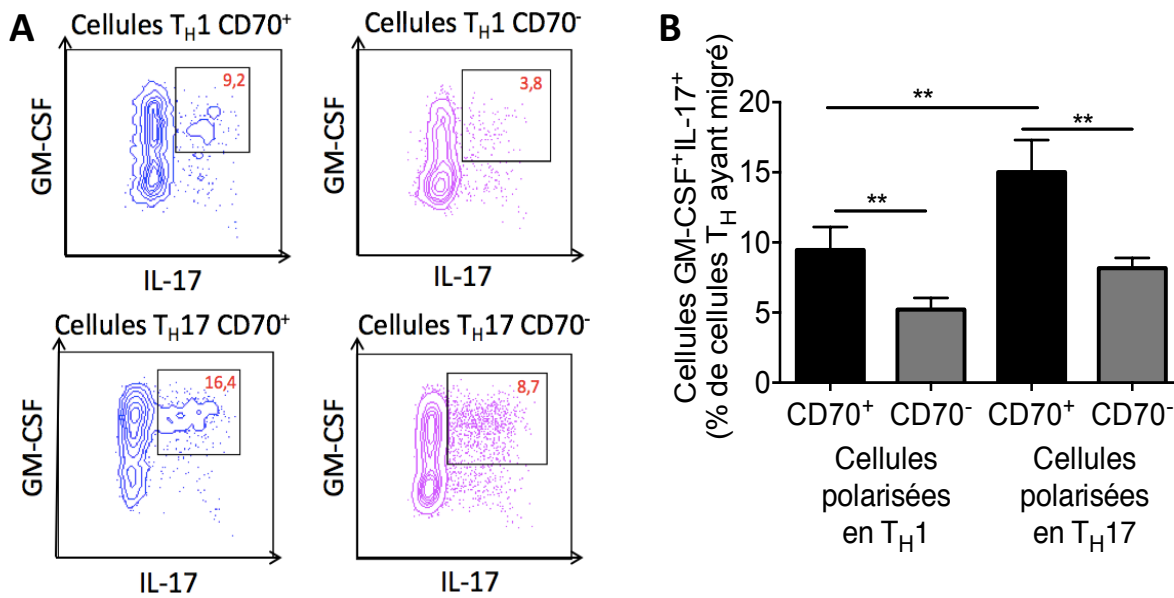


Figure 16. Les cellules $CD70^+GM-CSF^+IL-17^+$ migrent davantage à travers les CEBHE que les cellules $CD70^-GM-CSF^+IL-17^+$.

(A) Nuages de points représentatifs obtenus par cytométrie en flux et (B) pourcentage de cellules $CD70^+GM-CSF^+IL-17^+$ et $CD70^-GM-CSF^+IL-17^+$ polarisées en sous-types T_H1 et T_H17 ayant migré à travers les CEBHE (n=5 sujets sains). Le marquage intracellulaire des cytokines par cytométrie en flux a été effectué après une incubation de 4h à 37°C en présence de PMA, ionomycine et Golgi Plug. Un test t de Student païré a été utilisé, ** p<0,01.

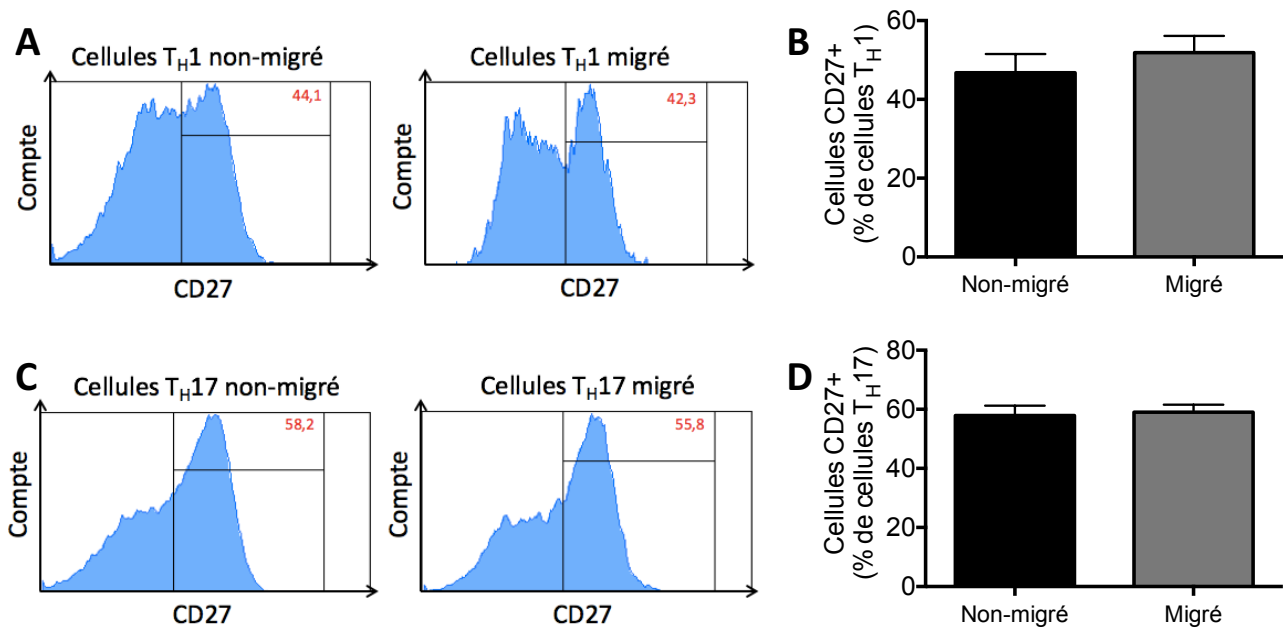


Figure 17. Les cellules polarisées en T_H1 et T_H17 expriment CD27 de manière équivalente avant et après la migration à travers les CEBHE.

Histogrammes représentatifs obtenus par cytométrie en flux et pourcentage de cellules CD27⁺ polarisées en (A et B) sous-types T_H1 et (C et D) T_H17 ayant migré ou non à travers les CEBHE (n= 5 sujets sains). Un test t de Student pairé a été utilisé.

3. La stimulation des cellules T CD4⁺ *in vitro* avec du TGF- β , augmente la production de cytokines par les cellules ayant migré à travers les CEBHE

Tel que mentionné précédemment, l'expression de CD70 sur les lymphocytes T CD4⁺ est augmentée en présence de certaines cytokines, particulièrement le TGF- β . Un essai de migration a donc été effectué afin d'étudier la transmigration des cellules T CD4⁺ à travers les cellules endothéliales de la BHE lorsqu'elles sont stimulées pendant 5 jours avec du TGF- β uniquement ou en combinaison avec des cytokines pro-inflammatoires, soit l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-23. Il est possible de constater qu'il n'y a pas de différence dans le nombre absolu de cellules ayant migré à travers les CEBHE lorsque les cellules sont stimulées avec du TGF- β uniquement ou en combinaison avec les autres cytokines (figure 18). Il n'y a pas non plus de différence dans l'expression de CD70 sur les cellules T CD4⁺ ayant migré à travers les CEBHE selon les cytokines avec lesquelles elles ont été stimulées (figure 19).

Toutefois, lorsqu'on s'intéresse à la production de cytokines par les cellules ayant migré, il est possible de voir qu'il y a significativement plus de cellules GM-CSF⁺CD70⁺ comparativement aux cellules GM-CSF⁺CD70⁻ qui ont migré à travers les CEBHE et ce, qu'elles aient été stimulées avec du TGF- β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines. Il en va de même pour les cellules IFN- γ ⁺CD70⁺, qui sont également plus nombreuses à avoir migré que les cellules IFN- γ ⁺CD70⁻, et ce, peu importe les conditions de stimulation (figure 20). Finalement, il y a une différence significative dans le pourcentage de cellules CD27⁺ ayant migré à travers les CEBHE comparativement aux cellules n'ayant pas migré, et ce, pour les deux conditions de stimulation, soit en présence de TGF- β uniquement ou en combinaison avec de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-23 (figure 21).

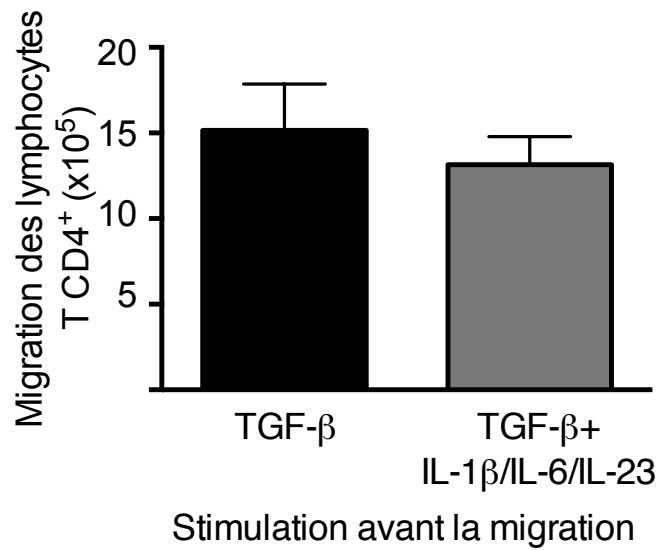


Figure 18. La transmigration des cellules T CD4⁺ stimulées avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines est équivalente.

Migration des lymphocytes T CD4⁺ à travers les CEBHE, après stimulation avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines (n=5 sujets sains).

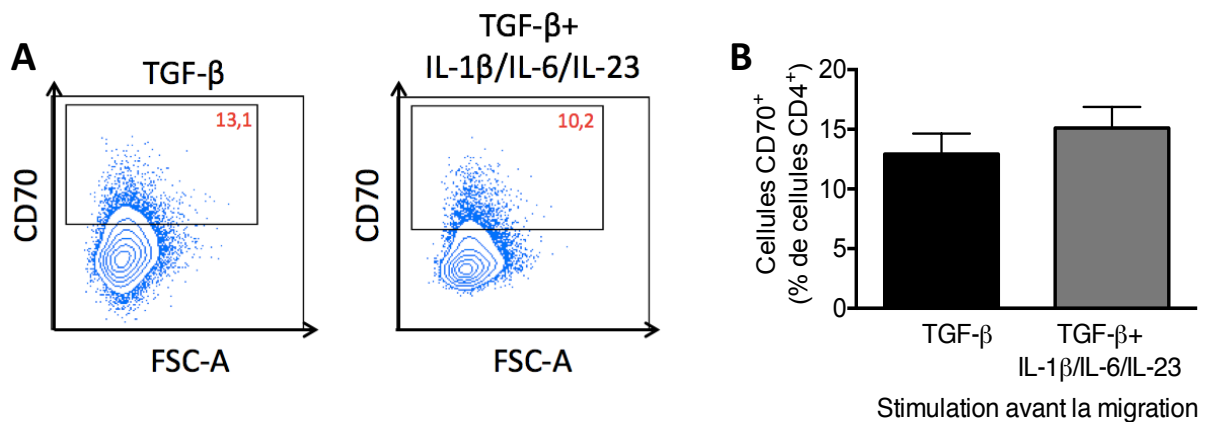


Figure 19. Les lymphocytes T CD4⁺ stimulés avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines expriment CD70 de manière équivalente après leur migration.

(A) Nuages de points représentatifs obtenus par cytométrie en flux et (B) pourcentage des lymphocytes T CD4⁺CD70⁺ ayant migré à travers les CEBHE, après stimulation avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines (n=5 sujets sains).

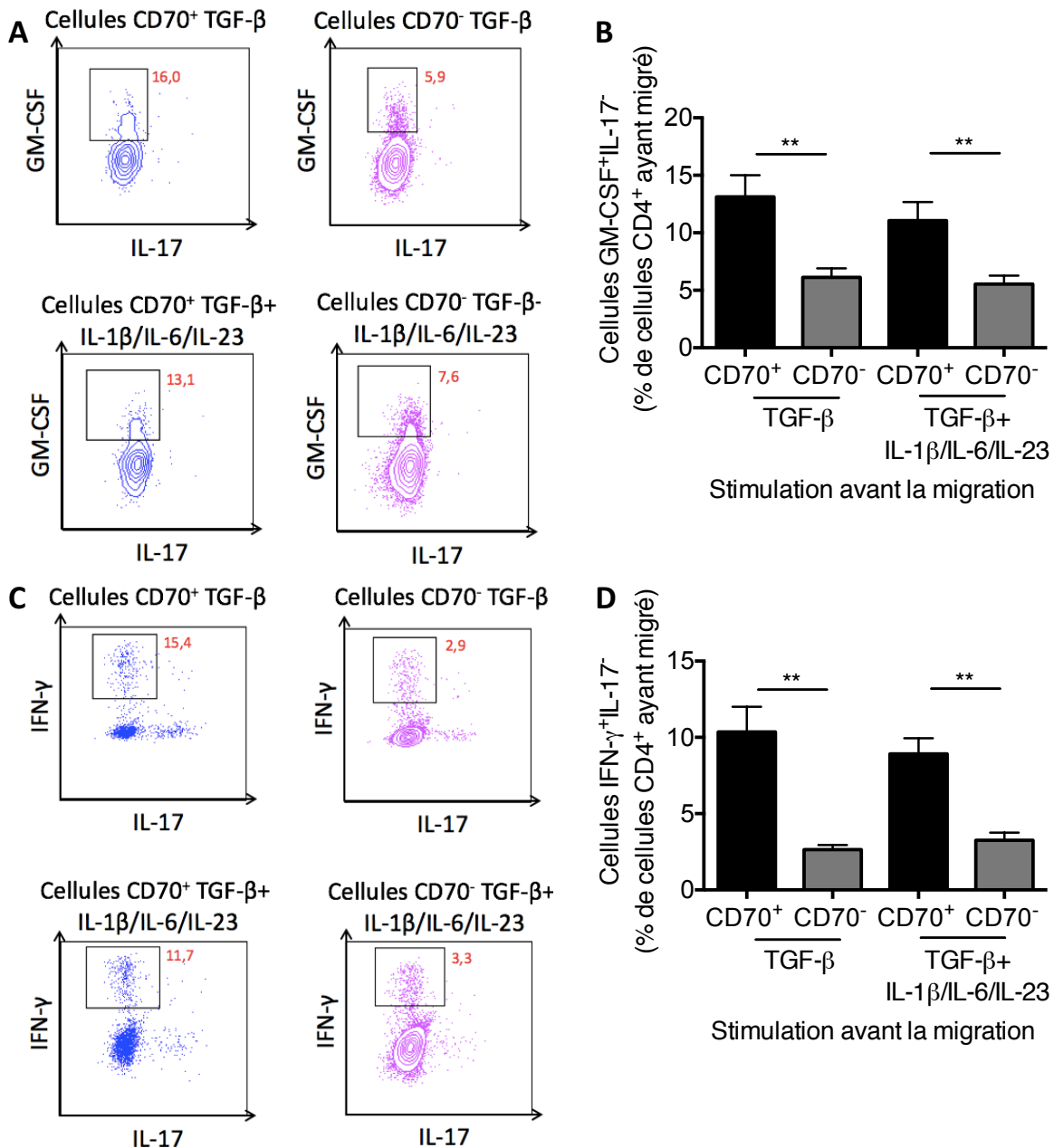


Figure 20. Les cellules CD70⁺GM-CSF⁺IL-17⁻ et CD70⁺IFN-γ⁺IL-17⁻ migrent davantage à travers les CEBHE que les cellules CD70⁻GM-CSF⁺IL-17⁻ et CD70⁻IFN-γ⁺IL-17⁻ lorsqu'elles sont stimulées avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines.

Nuages de points représentatifs obtenus par cytométrie en flux et pourcentage des lymphocytes T (A et B) CD4⁺CD70⁺GM-CSF⁺IL-17⁻ et (C et D) CD4⁺CD70⁺IFN-γ⁺IL-17⁻ ayant migré à travers les CEBHE, après stimulation avec du TGF-β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines (n=5 sujets sains). Le marquage intracellulaire des cytokines par cytométrie en flux a été effectué après une incubation de 4h à 37°C en présence de PMA, ionomycine et Golgi Plug. Un test t de Student pairé a été utilisé, ** p<0,01.

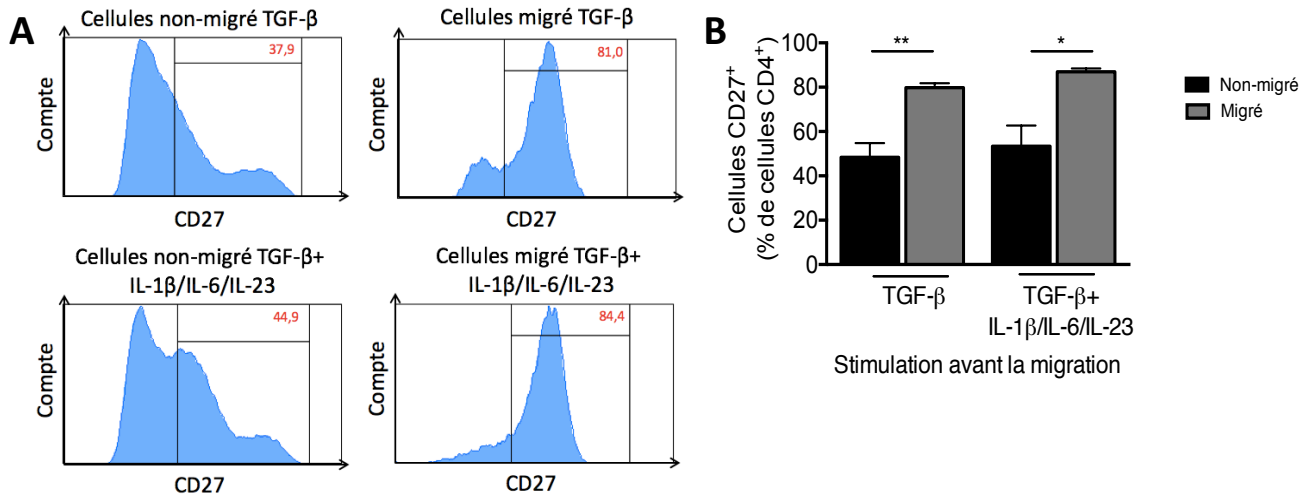


Figure 21. Les cellules polarisées ayant migré à travers les CEBHE expriment davantage CD27 que les cellules n'ayant pas migré.

(A) Histogrammes représentatifs obtenus par cytométrie en flux et (B) pourcentage de cellules CD27⁺ ayant migré ou non à travers les CEBHE après stimulation avec du TGF- β uniquement ou en combinaison avec d'autres cytokines. Un test t de Student pairé a été utilisé, * p<0,05 ; ** p<0,01.

4. CD27 et CD70 sont exprimés sur différents sous-types de cellules immunitaires dans le SNC de patients atteints de la SEP

La SEP est caractérisée par l'infiltration périvasculaire de cellules immunitaires dans le SNC. La présence de cellules T effectrices et des cellules B provenant du système immunitaire adaptatif ainsi que des cellules présentatrices d'antigènes du système immunitaire inné dans le cerveau de patients atteints de la SEP contribue au développement de la maladie (Baecher-Allan, Kaskow, and Weiner 2018). Ainsi donc, l'expression de CD27 et CD70 a tout d'abord été évaluée dans du tissu cérébral congelé post-mortem de patients atteints de la SEP. La coloration histologique au Luxol-Fast Blue et à l'hématoxyline & éosine a permis de localiser les zones où il y avait des infiltrations périvasculaires et de la démyélinisation, permettant ainsi d'identifier les lésions actives sur chacune des sections. L'immunofluorescence a ensuite été utilisée afin de marquer différents sous-types de cellules immunitaires et CD27/CD70 (figure 22 à 27). Il est tout d'abord possible de constater que des cellules T $CD4^+CD70^+$ sont présentes dans des lésions actives de la matière blanche de patients atteints de la SEP. Le marquage histologique permet de confirmer que les images ont bien été prises dans une infiltration périvasculaire avec démyélinisation (figure 22). Des lymphocytes T $CD4^+CD27^+$ (figure 23), $CD8^+CD70^+$ (figure 24) et $CD8^+CD27^+$ (figure 25) sont également visibles dans les lésions actives des patients atteints de la SEP. Toutefois, tel que mentionné précédemment, les lymphocytes T ne sont pas les seuls types de cellules immunitaires pouvant se trouver dans les lésions de la matière blanche du SNC des patients atteints de la SEP. Par exemple, des cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques peuvent s'y retrouver. Ainsi, des cellules $CD11c^+CD70^+$ ont pu être retrouvées dans les lésions (figure 26)(Nuyts et al. 2013). Les lymphocytes B jouent eux aussi un rôle critique dans le développement et l'évolution de la SEP(Michel et al. 2015). Il est aussi possible de voir que des cellules $CD20^+CD70^+$ sont également présentes dans les lésions actives des patients atteints de la SEP (figure 27). Ensuite, des cellules immunitaires provenant de lésions coupées dans le cerveau d'un patient atteint de la SEP lors de l'autopsie ont été isolées et analysées par cytométrie en flux. Des cellules $CD4^+CD70^+$ (figure 28) et $CD4^+CD27^+$ (figure 29) ont pu être détectées dans les différents types de lésions localisées dans la matière blanche et dans le cortex. Le type de lésion a été classifié à l'aide de marquages histologiques.

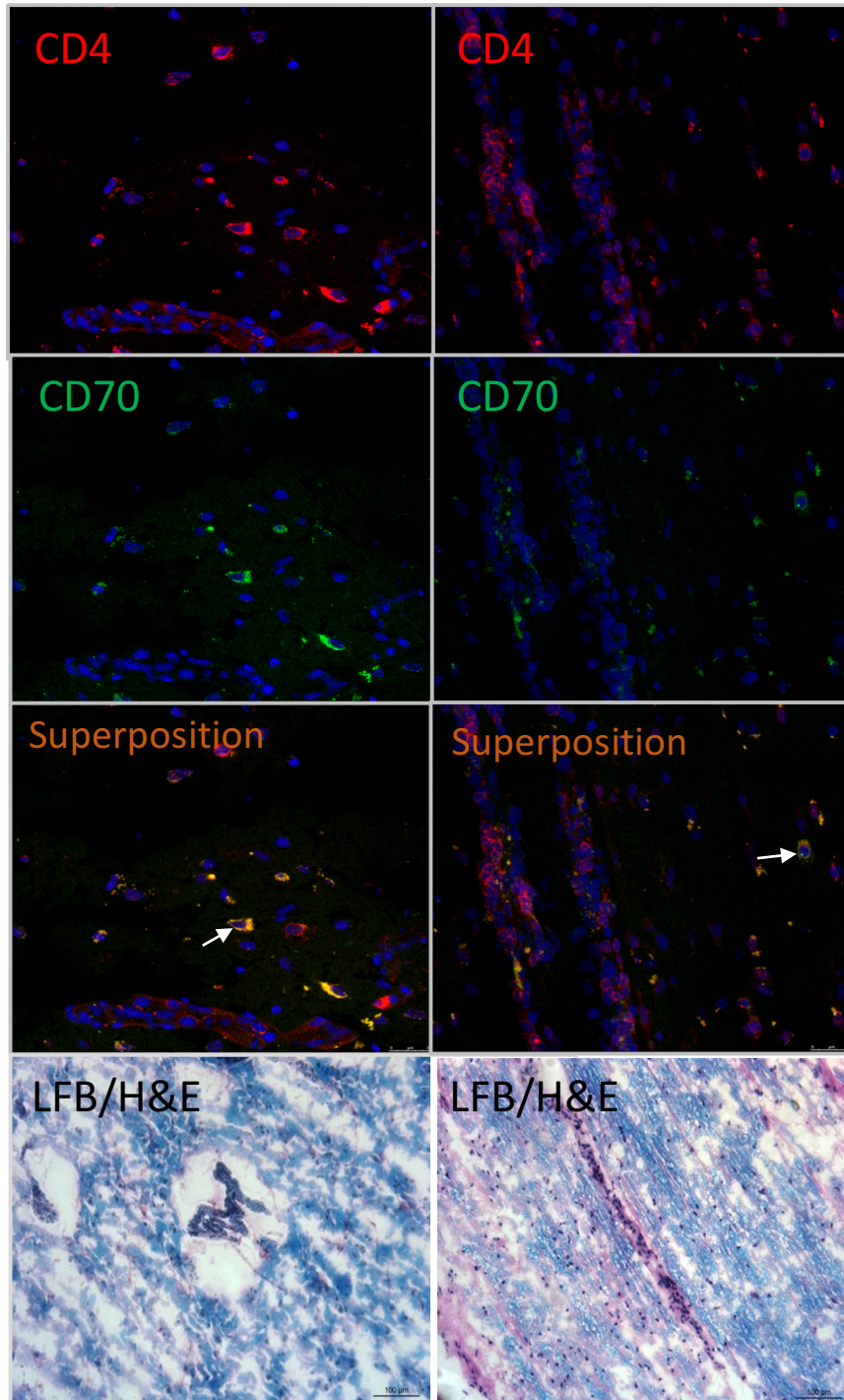


Figure 22. Des cellules $CD4^+CD70^+$ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP

Marquage immunologique des lésions actives de la matière blanche sur sections congelées de tissus du SNC de patients atteints de la SEP. Les cellules T $CD4^+$ sont marquées en rouge, les cellules $CD70^+$ sont marquées en vert, les noyaux en bleu. Les cellules $CD4^+CD70^+$ sont pointées avec les flèches blanches. Représentatif de $n=3$ patients atteints de la SEP, pour un total de 18 lésions.

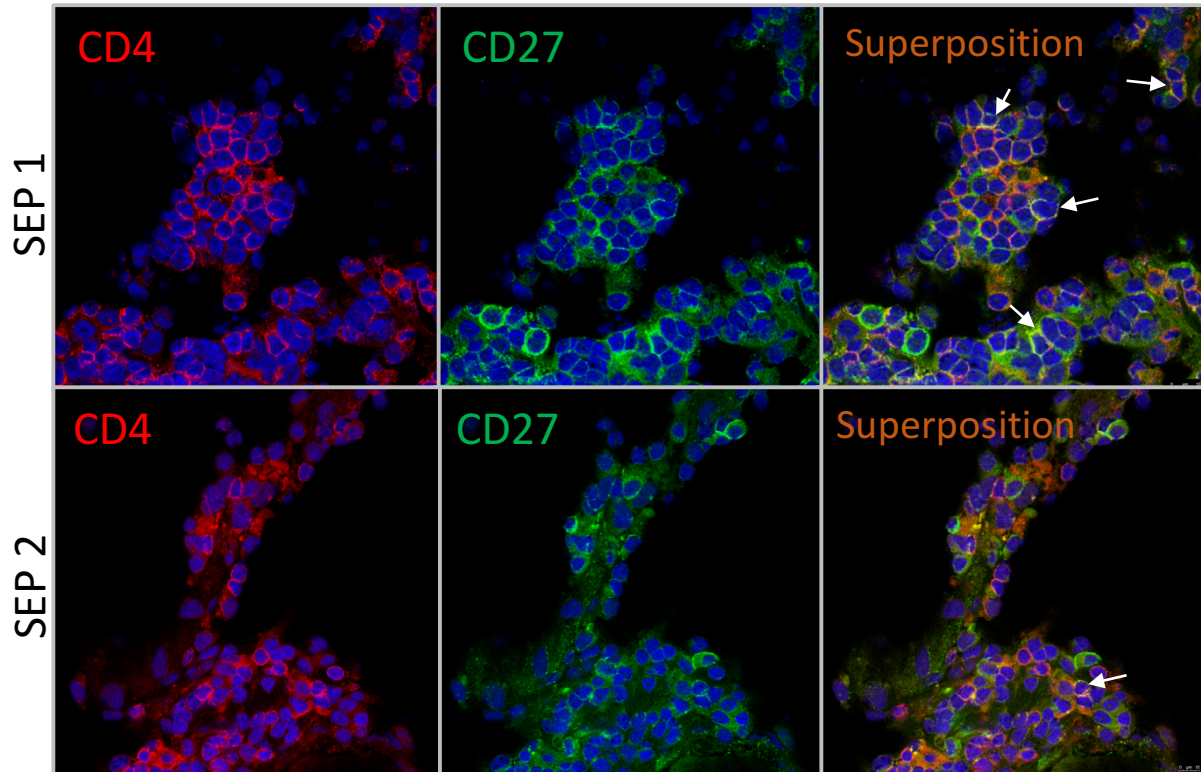


Figure 23. Des cellules $CD4^+CD27^+$ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP

Marquage immunologique des lésions actives de la matière blanche sur sections congelées de tissus du SNC de patients atteints de la SEP. Les cellules T $CD4^+$ sont marquées en rouge, les cellules $CD27^+$ sont marquées en vert, les noyaux en bleu. Les cellules $CD4^+CD27^+$ sont pointées avec les flèches blanches. Représentatif de $n=3$ patients atteints de la SEP, pour un total de 18 lésions

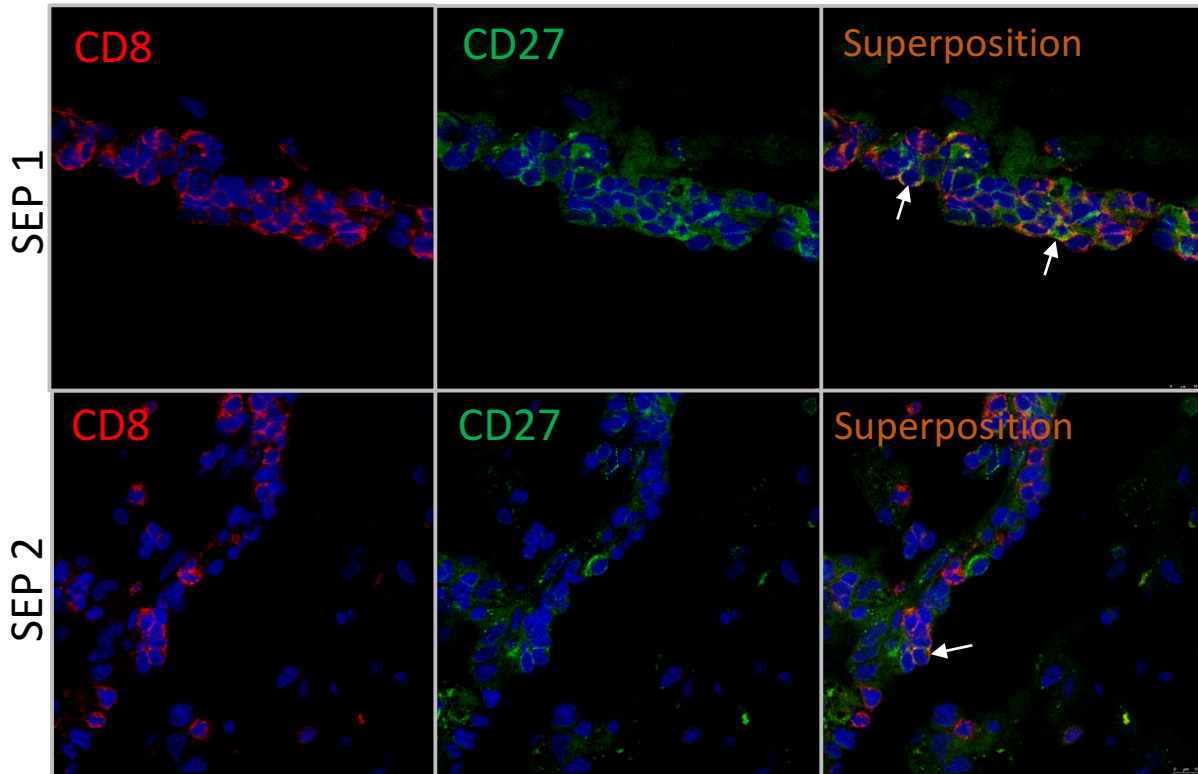


Figure 24. Des cellules $CD8^+CD27^+$ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP

Marquage immunologique des lésions actives de la matière blanche sur sections congelées de tissus du SNC de patients atteints de la SEP. Les cellules T $CD8^+$ sont marquées en rouge, les cellules $CD27^+$ sont marquées en vert, les noyaux en bleu. Les cellules $CD8^+CD27^+$ sont pointées avec les flèches blanches. Représentatif de $n=3$ patients atteints de la SEP, pour un total de 18 lésions

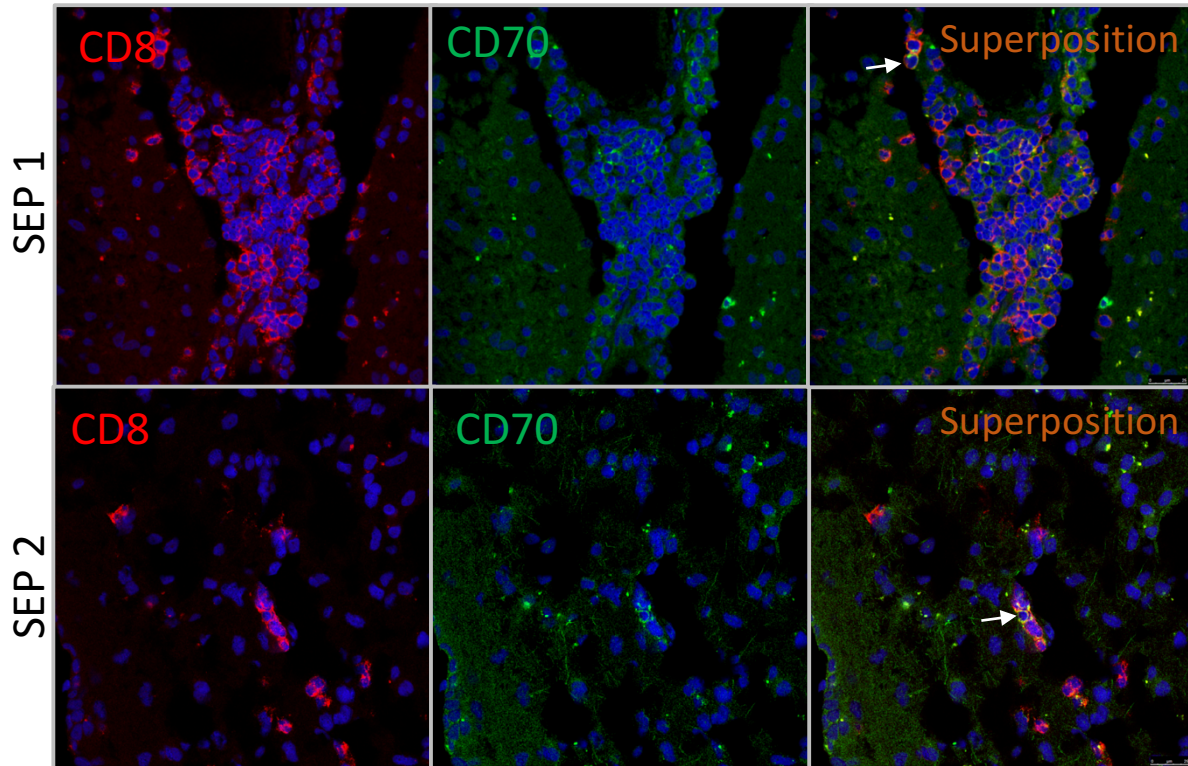


Figure 25. Des cellules $CD8^+CD70^+$ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP

Marquage immunologique des lésions actives de la matière blanche sur sections congelées de tissu du SNC de patients atteints de la SEP. Les cellules T $CD8^+$ sont marquées en rouge, les cellules $CD70^+$ sont marquées en vert, les noyaux en bleu. Les cellules $CD8^+CD70^+$ sont pointées avec les flèches blanches. Représentatif de $n=3$ patients atteints de la SEP, pour un total de 18 lésions

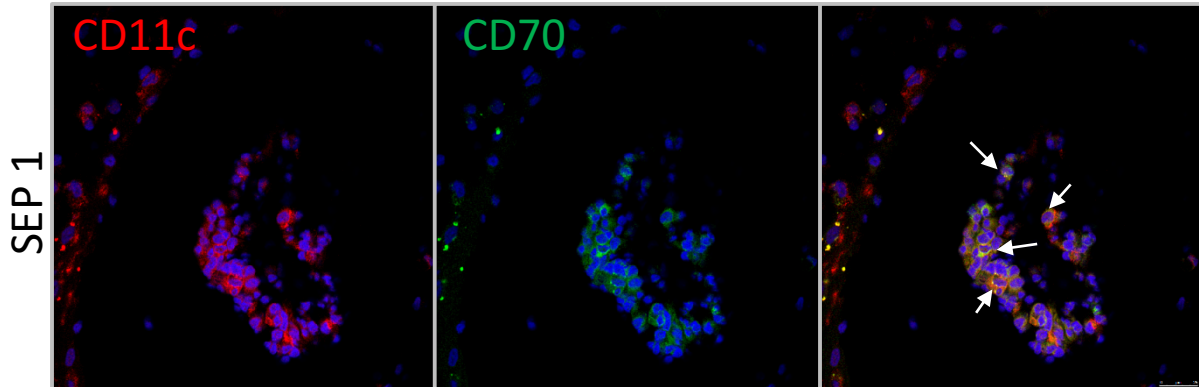


Figure 26. Des cellules $CD11c^+CD70^+$ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP

Marquage immunologique des lésions actives de la matière blanche sur sections congelées de tissus du SNC de patients atteints de la SEP. Les cellules T $CD11c^+$ sont marquées en rouge, les cellules $CD70^+$ sont marquées en vert, les noyaux en bleu. Les cellules $CD11c^+CD70^+$ sont pointées avec les flèches blanches. Représentatif de n=3 patients atteints de la SEP, pour un total de 18 lésions

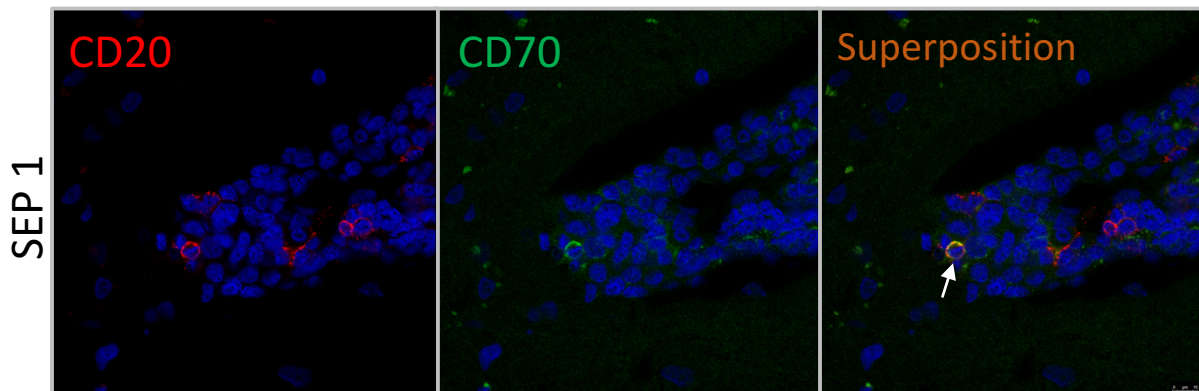


Figure 27. Des cellules $CD20^+CD70^+$ sont présentes dans les lésions actives du SNC de patients atteints de la SEP

Marquage immunologique des lésions actives de la matière blanche sur sections congelées de tissus du SNC de patients atteints de la SEP. Les cellules T $CD20^+$ sont marquées en rouge, les cellules $CD70^+$ sont marquées en vert, les noyaux en bleu. Les cellules $CD20^+CD70^+$ sont pointées avec les flèches blanches. Représentatif de n=3 patients atteints de la SEP, pour un total de 18 lésions

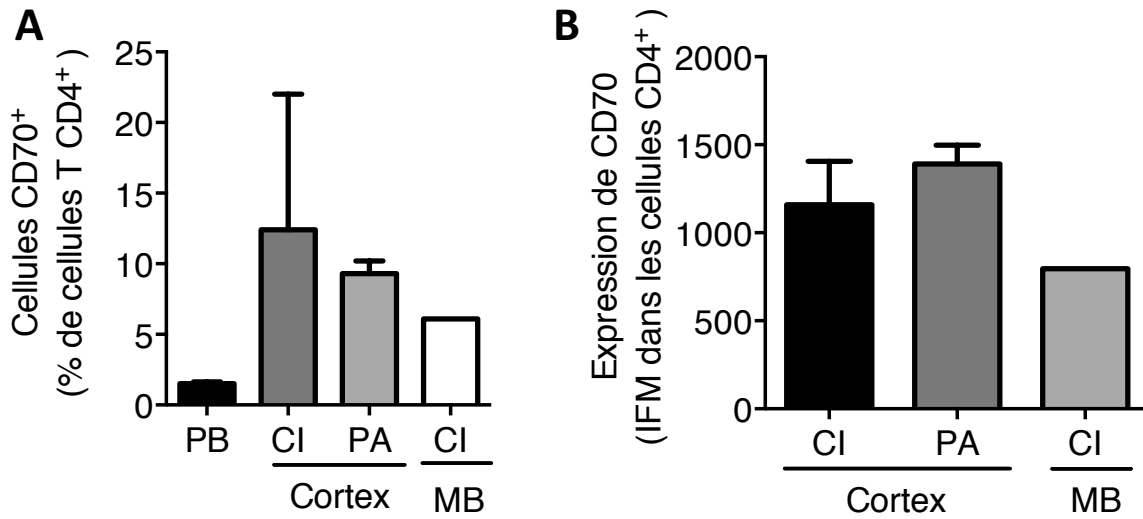


Figure 28. Des cellules CD4⁺CD70⁺ se trouvent dans les lésions préactives et chroniques inactives du cortex et de la matière blanche dans le cerveau de patients atteints de la SEP.

(A) Pourcentage de CD70 sur les cellules T CD4⁺ présentes dans les lésions chroniques inactives (CI) du cortex (n=2) et de la matière blanche (n=1) et dans les lésions préactives du cortex (n=2) provenant du cerveau de patients atteints de la SEP (n=1) et sur les cellules T CD4⁺ d'un patient non traité atteint de la RRMS. (B) Expression de CD70 sur les cellules T CD4⁺ (intensité de fluorescence moyenne, IFM) trouvées dans les différentes lésions.

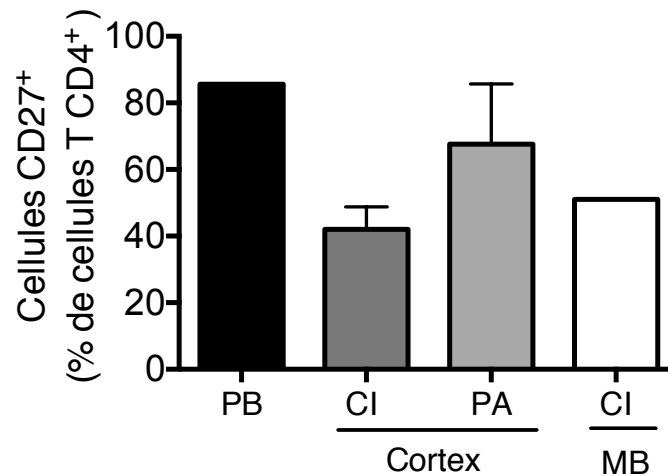


Figure 29. Des cellules CD4⁺CD27⁺ se trouvent dans les différents types de lésions du cortex et de la matière blanche dans le cerveau de patients atteints de la SEP.

Expression de CD27 sur les cellules T CD4⁺ présentes dans les lésions chroniques inactives (CI) du cortex (n=2) et de la matière blanche (n=1) et dans les lésions préactives du cortex (n=2) provenant du cerveau de patients atteints de la SEP (n=1) et sur les cellules T CD4⁺ d'un patient non traité atteint de la RRMS.

5. L'ajout de CD27 soluble favorise la différenciation en lymphocytes aux caractéristiques pro-inflammatoires

Tel que mentionné précédemment, l'expression de CD70 est plus élevée sur les cellules T CD4⁺ de patients atteints des différentes formes de la sclérose en plaques comparativement aux sujets sains. Ainsi, afin d'étudier l'impact et la fonction de l'expression de CD70 sur les lymphocytes T CD4⁺, les voies de signalisation cellulaires activées dans les cellules T CD4⁺CD70⁺ ont été étudiées. Des cellules T CD4⁺ provenant de sujets sains ont été cultivées en présence de TGF- β afin d'augmenter l'expression de CD70. Du CD27 soluble a ensuite été ajouté au jour 4, 5 et 6 de la stimulation, afin de lier CD70 et ainsi d'activer les voies de signalisation. L'expression des facteurs de transcription FOXP3, GATA3, ROR γ T et Tbet a été évaluée par cytométrie en flux au jour 6. La production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , l'IL-17 et le GM-CSF a été évaluée au jour 6 et 7, également par cytométrie en flux. Tous les résultats sont présentés sous forme d'un ratio entre le résultat en présence ou en absence de CD27 soluble.

Après l'ajout de CD27 soluble pendant deux jours, il est possible d'observer certains résultats au niveau protéique, par cytométrie en flux. En effet, l'expression des facteurs de transcription ROR γ T et Tbet semble augmenter alors que l'expression de FOXP3 et GATA3 semble moindre (figure 30). Lorsqu'on compare la production de cytokines à l'aide du ratio présence/absence de CD27 soluble pendant deux ou trois jours, il est possible de constater que la production d'IL-17 et de GM-CSF est augmentée de manière significative comparativement à celle d'IFN- γ seulement après trois jours (Figure 31 B). Toutefois, lorsque l'on compare directement la production de cytokines en présence ou absence de CD27 soluble, aucune différence significative n'est observée (Figure 33; Annexe).

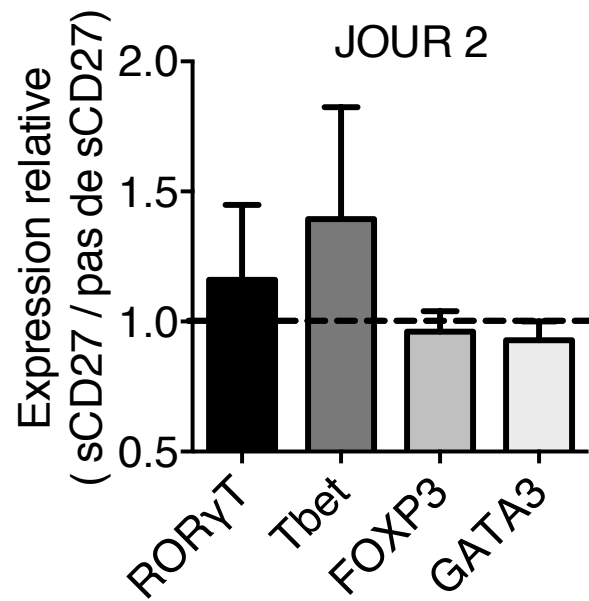


Figure 30. L'expression des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation en sous-types T_H1 et T_H17 semble augmenter suite à l'ajout de CD27 soluble.

Expression relative de ROR γ T, Tbet, GATA3 et FOXP3 dans les cellules T CD4⁺ après 5 jours de stimulation avec du TGF- β en présence de CD27 soluble (8ng/mL) ou pas pendant 2 jours, mesurée par cytométrie en flux pour n=6 sujets sains. Un test t de Student païré a été utilisé. Les données sont exprimées relativement au contrôle et/ou l'ajout de CD27 soluble.

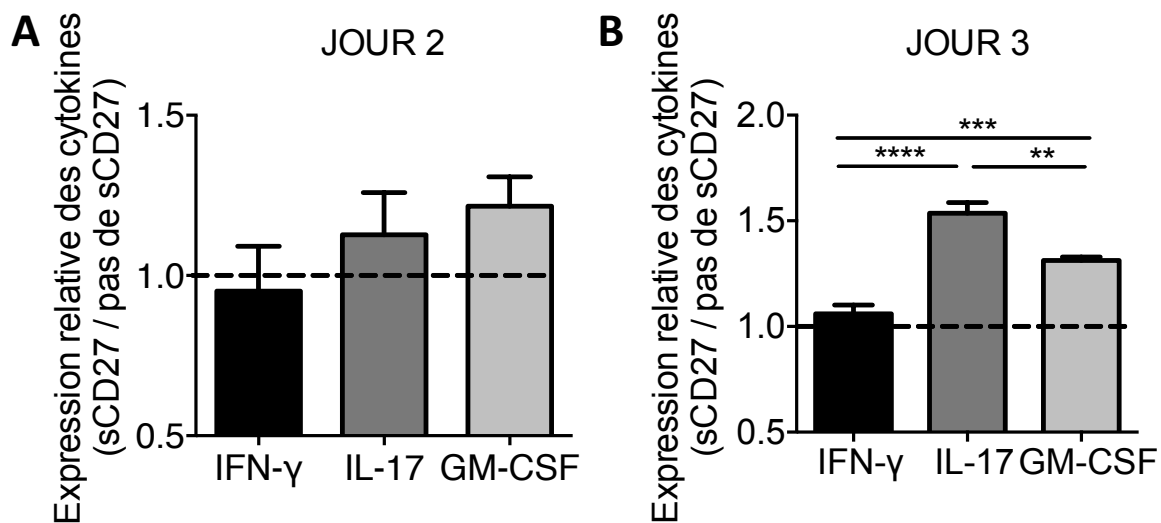


Figure 31. L'ajout de CD27 soluble a un impact sur la production d'IL-17 et de GM-CSF par les cellules T CD4⁺.

Expression relative d'IFN- γ , d'IL-17 et de GM-CSF, mesurée par cytométrie en flux, dans les cellules T CD4⁺ après 5 jours de stimulation avec du TGF- β en présence de CD27 soluble (8ng/mL) ou pas, pendant (A) 2 jours et (B) 3 jours pour n=6 sujets sains. Un test t de Student pairé a été utilisé, ** p<0,01; *** p<0.001; **** p<0.0001. Les données sont exprimées relativement à l'ajout de CD27 soluble.

Discussion

Une réponse T efficace nécessite non seulement la reconnaissance de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité, mais aussi un signal de costimulation, qui peut améliorer l'activation, la division et la survie cellulaire ainsi que l'induction des fonctions effectrices (Croft 2003, 2009; Watts 2005). Les molécules de la famille des TNF, notamment le récepteur CD27 et son unique ligand CD70, peuvent fournir ce signal de costimulation. CD27 est exprimé sur les lymphocytes T naïfs de manière constitutive ainsi que sur les cellules T centrales mémoires et transitoires mémoires alors que les cellules T effectrices mémoires ne l'expriment pas (Riou 2007). De plus, l'expression de CD27 au niveau des cellules CD4⁺CD25⁺ permet d'identifier une population de cellules T régulatrices (Duggleby et al. 2007; Ruprecht et al. 2005). CD27 est également exprimé sur les cellules NK et les cellules B mémoire et peut être clivé par des métalloprotéinases matricielles afin de se retrouver sous forme soluble (Kato et al. 2007; Lens et al. 1998). CD70 est exprimé principalement par les cellules dendritiques, les cellules NK, les cellules épithéliales médullaires thymiques ainsi que par les lymphocytes B et T activés (Seko et al. 2002). La voie costimulatrice CD27/CD70 est impliquée dans la pathogenèse de diverses maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux (Han, Olsen, and Bottaro 2016; Park et al. 2014) mais elle a très peu été étudiée dans le contexte de la SEP. Des données obtenues dans le laboratoire ont montré que l'expression de CD70 est plus élevée sur les cellules T CD4⁺ de patients atteints de la SEP comparativement aux sujets sains, tel qu'observé dans le contexte d'autres maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux (Park et al. 2014; Han et al. 2005). L'expression de CD70 sur les lymphocytes T CD4⁺ est également augmentée en présence de certaines cytokines, particulièrement le TGF- β (Yang et al. 2014). Finalement, l'expression de CD70 est aussi plus élevée sur les cellules polarisées en sous-types pro-inflammatoires T_H1 et T_H17 comparativement aux cellules T_H2 non inflammatoires. Une association entre la voie CD27/CD70 et la différenciation en sous-types T_H1 et T_H17 avait précédemment été identifiée chez l'humain (Pen et al. 2013; van Oosterwijk et al. 2007; Atarashi et al. 2008).

Ainsi, l'hypothèse initiale de ce projet de recherche est que la voie costimulatrice CD27/CD70 joue un rôle dans la réponse inflammatoire et dans la transmigration des cellules T CD4⁺ à travers la barrière hématoencéphalique dans la sclérose en plaques. Il a tout d'abord été possible de constater que CD70, mais pas CD27, est présent à la surface des cellules endothéliales de la BHE. De plus, l'expression de CD70 est significativement augmentée en condition de culture pro-inflammatoire. Ce résultat n'est pas totalement inattendu, car bien que l'expression des membres de la famille des TNF sur les cellules endothéliales de la BHE n'ait jamais été étudiée, il avait déjà été montré que les ligands de la famille des TNF peuvent être exprimés sur les cellules endothéliales du tissu myocardique et de l'intestin en condition d'inflammation (Seko et al. 2002; Souza et al. 1999). Ainsi donc, l'expression des ligands de la famille des TNF, incluant CD70, est augmentée sur les cellules endothéliales en conditions inflammatoires. Cela pourrait indiquer une interaction potentielle entre les récepteurs de la famille des TNF se trouvant sur les cellules immunitaires et leurs ligands sur les cellules endothéliales. Si elle a lieu, cette interaction pourrait contribuer davantage aux fonctions des cellules T effectrices en plus de promouvoir une réponse inflammatoire par les cellules endothéliales, qui permettrait alors la propagation de l'inflammation dans un contexte de maladie. Il serait maintenant important de déterminer à quel niveau des cellules endothéliales l'expression de CD70 est observée, ce qui pourrait permettre une meilleure compréhension de son rôle et de ses fonctions sur ce type cellulaire dans le contexte de maladies inflammatoires.

La forme soluble des différents récepteurs de la famille des TNF tel que 4-1BB a été étudiée de manière extensive et est envisagée à titre de marqueur d'activité potentiel pour certaines maladies comme la polyarthrite rhumatoïde ou la SEP (Ward-Kavanagh et al. 2016; Jung et al. 2004; Sharief 2002; Liu et al. 2006). Par exemple, CD27, une fois clivé par les métalloprotéinases (Kato et al. 2007), est retrouvé dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de la SEP et pourrait potentiellement agir à titre de marqueur d'inflammation lors du diagnostic des patients (Komori et al. 2015; van der Vuurst de Vries et al. 2017). Plusieurs ligands de la famille des TNF peuvent se retrouver sous forme soluble, soit par protéolyse de la tige ou encore par épissage alternatif (Wajant 2016). La présence naturelle d'une forme soluble de CD70 et ses fonctions potentielles ont fait l'objet de débat, bien qu'il ait été montré que quelques variantes solubles peuvent se lier au CD27 (Cormary et al. 2004; Miller et al. 2010;

Wyzgol et al. 2009). Toutefois, rien n'avait été étudié à ce jour sur l'impact potentiel d'une forme soluble des ligands de la famille des TNF dans la SEP. Après avoir établi que CD70 est exprimé sur les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique, l'hypothèse était que le CD70 se trouvant sur ces dernières pouvait potentiellement être clivé et sécrété, se retrouvant ensuite sous forme soluble dans le sérum et le LCR des patients atteints de la SEP. Ainsi, nous avons montré que la forme soluble de CD70 est présente dans le surnageant des CEBHE cultivées dans les différents milieux de culture, ce qui indique que cette dernière peut effectivement être sécrétée par les CEBHE. La forme soluble de CD70 est aussi présente uniquement dans le LCR et pas dans le sérum des patients atteints de la SEP, avec une concentration plus élevée dans le LCR des patients atteints de la forme cyclique comparativement à la forme progressive ou bien aux patients contrôles étant atteints d'autres maladies neurologiques. Ainsi, la forme soluble de CD70 pourrait potentiellement être utilisée comme biomarqueur pour l'activation des cellules T puisqu'elle est détectée dans le LCR de patients atteints des différentes formes de SEP. Toutefois, le rôle et les fonctions des formes solubles de CD27 et CD70 dans le LCR des patients atteints de la SEP doivent être investigués. La présence de BOC au niveau du LCR est un indicateur de synthèse d'anticorps intrathécaux par les plasmocytes (Reiber, Ungefehr, and Jacobi 1998; Reiber 2016; Fraussen et al. 2009). Ainsi, puisque les cellules B jouent elles aussi un rôle important dans la SEP (Michel et al. 2015) et qu'elles expriment CD70, une autre hypothèse serait que la forme soluble de CD70 se trouvant dans le LCR provient en fait des plasmocytes intrathécaux. Il serait donc important d'étudier davantage l'expression de CD70 sur ce type cellulaire dans le contexte de la SEP.

L'altération de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique par l'inflammation et la transmigration de lymphocytes pathogéniques et autoréactifs dans le système nerveux central sont des caractéristiques centrales à la pathogenèse de la sclérose en plaques (Dendrou, Fugger, and Friese 2015). Il est donc essentiel d'étudier la migration des différents types de leucocytes à travers la BHE, afin de déterminer lesquels peuvent transmigrer plus facilement et l'impact potentiel qu'ils auront une fois dans le SNC. Une association entre la voie costimulatrice CD27/CD70 et la différenciation en sous-type T_H1 (Pen et al. 2013; van Oosterwijk et al. 2007) et T_H17 (Atarashi et al. 2008) a préalablement été identifiée chez l'humain. De plus, tel que mentionné précédemment, les cellules T_H1 et T_H17 expriment de hauts niveaux de CD70 et ont

été identifiées comme étant particulièrement pathogéniques suite à leur transmigration dans le SNC dans le contexte de la SEP (Kaskow and Baecher-Allan 2018). Il a été noté que l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-CD70 ne semble pas avoir d'effet sur la migration de ces cellules à travers la BHE ou sur la production de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules une fois qu'elles ont transmigré. Toutefois, il serait important de vérifier que la signalisation de la voie CD27/CD70 est réellement inhibée en présence de l'anticorps bloquant anti-CD70, afin de s'assurer que CD70 n'affecte réellement pas le potentiel migratoire des cellules T CD4⁺. Il serait aussi intéressant de tester un autre protocole de blocage de CD70 puisque des données obtenues précédemment dans le laboratoire par Dre Tessa Dhaeze montrent que l'ajout quotidien d'anticorps bloquant anti-CD70 lors de la polarisation en cellules T_{H1} a pour effet de réduire l'expression au niveau de l'ARN messager du facteur de transcription Tbet et de l'IFN- γ ainsi que le pourcentage de cellules IFN- γ ⁺ au niveau protéique. De plus, une étude effectuée avec un modèle murin d'EAE a montré que seul le traitement préventif de souris SJ/L avec un anticorps monoclonal contre CD70 empêchait le développement de l'EAE active. (Nakajima et al. 2000). Ainsi, le traitement quotidien des cellules T_{H1} et T_{H17} lors de leur polarisation plutôt que seulement une heure avant le début de l'essai de migration aurait pu avoir un impact différent sur la transmigration à travers les CEBHE et la production de cytokines.

Cependant, cet essai de transmigration a permis de constater que le pourcentage et le nombre absolu de cellules T_{H17} ayant migré à travers les CEBHE sont significativement plus élevés que pour les cellules T_{H1} (Données non incluses), tel que montré préalablement dans notre laboratoire (Kebir et al. 2007). Le nombre absolu de cellules T_{H17} CD70⁺ ayant migré à travers les CEBHE est aussi significativement plus élevé que le nombre absolu de cellules T_{H1} CD70⁺ ayant migré. Ce n'était pas le cas pour leurs homologues CD70⁻. De plus, une plus grande proportion des cellules ayant migré et produisant des cytokines pro-inflammatoires sont CD70⁺. Cela indique clairement que les cellules CD70⁺ ayant migré à travers les CEBHE présentent un phénotype nettement plus pro-inflammatoire que leurs homologues CD70⁻. Ainsi, le profil pro-inflammatoire des cellules CD70⁺ est maintenu suite à leur transmigration à travers les CEBHE. Il serait maintenant pertinent de déterminer les facteurs de transcription exprimés dans ces cellules qui ont migré puisque les facteurs de transcription Tbet et ROR γ T peuvent être co-exprimés dans la même cellule (Kebir et al. 2009). Finalement, il a été possible de montrer que

l'expression de CD27 sur les sous-types T_H1 et T_H17 est équivalente sur les cellules ayant migré ou non à travers les CEBHE. En effet, l'expression de CD27 sur les cellules T_H ne semble pas avoir d'impact au niveau de la transmigration cellulaire ou bien la production de cytokine.

Après avoir observé ces résultats au niveau de l'essai de migration avec les cellules polarisées en sous-type T_H1 et T_H17 , nous nous sommes intéressés à l'impact de la stimulation des cellules $T CD4^+$ avec du TGF- β uniquement ou en combinaison avec diverses cytokines soit de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-23, sur la transmigration à travers les CEBHE. Le TGF- β est une cytokine pleiotrophique qui peut réguler la différenciation et la fonction des cellules T (Lee, Severin, and Lovett-Racke 2017). Elle peut influencer la différenciation des cellules $T CD4^+$ naïves en cellules T effectrices au phénotype distinct, soit principalement les cellules T_{Reg} (Chen et al. 2003) et T_H17 (Bettelli et al. 2006; Mangan et al. 2006) ou encore, agir en tant que régulateur négatif de la différenciation en cellules T_H1 (Gorelik, Constant, and Flavell 2002). Il a été démontré qu'au commencement de l'EAE chez la souris, le niveau de TGF- β présent dans le SNC augmente rapidement (Parsa et al. 2016; Speck et al. 2014). Il est aussi intéressant de noter que la présence de TGF- β entraîne une augmentation de l'expression de CD70 sur les cellules T effectrices mémoire. Ainsi, suite à l'essai de migration, il a été possible de constater que les deux stimulations, soit avec du TGF- β uniquement ou en combinaison avec les autres cytokines résultaient en une transmigration équivalente à travers les CEBHE. De plus, l'expression de CD70 sur les cellules ayant migré à travers les CEBHE était aussi équivalente pour les deux stimulations. Ainsi, ces résultats semblent indiquer que le TGF- β est une cytokine importante affectant l'expression de CD70 et sa transmigration à travers les CEBHE. Puisqu'il a déjà été montré que le TGF- β est présent dans le SNC (Pratt and McPherson 1997), il serait intéressant d'investiguer le rôle potentiel de cette cytokine dans un changement de fonction et de phénotype des cellules $T CD4^+$ effectrices présentes dans le SNC et si cela est relié à la présence de CD70 dans le contexte de la SEP.

Ensuite, les cellules $CD70^+$ produisant des cytokines migrent davantage à travers les CEBHE que leurs homologues $CD70^-$. L'expression de CD70 est donc clairement liée à un type cellulaire au phénotype pro-inflammatoire et ce, peu importe les conditions de stimulation. Finalement, l'expression de CD27 est augmentée suite à la transmigration à travers les CEBHE. Toutefois,

il a été montré que la stimulation avec le TGF- β augmente significativement le clivage de CD27 à la surface des cellules T activées vers sa forme soluble (Yang et al. 2014). Il serait donc important de comparer l'expression de la forme soluble de CD27 avant et après la migration à travers le CEBHE afin de déterminer si l'augmentation observée de l'expression de CD27 à la surface des cellules T CD4⁺ après la migration est réelle et n'est pas simplement due à une diminution du clivage de CD27.

Par la suite, un plus grand nombre de cellules CD4⁺CD70⁺, CD4⁺CD27⁺, CD8⁺CD70⁺, CD8⁺CD27⁺, CD11c⁺CD70⁺ et CD20⁺CD70⁺ sont présentes dans les infiltrats périvasculaires des lésions actives et préactives comparativement aux lésions chroniques inactives, dans le cerveau de patients atteints de la SEP. De plus, le pourcentage de cellules CD4⁺CD70⁺ est plus élevé dans les lésions du SNC que dans le sang périphérique d'un patient atteint de la forme cyclique de la maladie alors que le pourcentage de cellules CD4⁺CD27⁺ semble être plus élevé dans le sang périphérique comparativement aux différents types de lésions. L'expression de CD70 et de CD27 semble être plus élevée dans les lésions préactives du cortex comparativement aux lésions chroniques inactives du cortex ou de la matière blanche. Ainsi, l'ensemble de ces données confirment le rôle inflammatoire qu'ont les leucocytes, particulièrement les lymphocytes T, CD27⁺ et CD70⁺ dans l'immunopathogénèse du système nerveux central. Ces lymphocytes pourraient donc être potentiellement impliqués dans la formation de lésions actives et préactives dans le contexte de la SEP. Il serait très intéressant de réaliser d'autres marquages par immunohistofluorescence dans le SNC de patients atteints de la SEP afin de caractériser les lymphocytes CD70⁺ se trouvant dans les différents types de lésions, notamment au niveau de la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17 ou encore de l'IFN- γ . De plus, l'utilisation de marquages par immunohistofluorescence afin de comparer l'expression de CD70 à la surface des cellules endothéliales se trouvant ou non dans les lésions serait une autre avenue à explorer.

Suite à la liaison de CD70 se trouvant à la surface des CPA avec CD27 sur les lymphocytes, les facteurs de transcription NF κ B, JNK, AP1 et NFAT sont activés, via TRAF2 et TRAF5 (Akiba et al. 1998; Seko et al. 2002; Cannons, Choi, and Watts 2000). Il y a toutefois peu d'information disponible à ce jour sur les voies de signalisation intracellulaires impliquées au niveau des

lymphocytes T CD70⁺. Il a été démontré que CD70 peut activer les voies de signalisation reliées à la PI3K et au MAPK (Arens et al. 2004; Garcia et al. 2004). Au niveau des cellules B, CD70 régule le cycle cellulaire alors qu'au niveau des cellules NK, son expression peut entraîner la cytotoxicité (Borst, Hendriks, and Xiao 2005). Puisque nous avons montré que les cellules CD4⁺CD70⁺ présentent un profil pro-inflammatoire suite à leur transmigration et que ces cellules sont retrouvées dans le SNC des patients atteints de la SEP, il est primordial d'identifier les voies de signalisation impliquées suite à leur activation, afin d'évaluer l'ampleur de leur impact potentiel une fois dans le SNC. Ainsi, il semble que l'ajout de CD27 soluble, qui peut se lier au CD70 se trouvant à la surface des cellules T CD4⁺, entraîne une augmentation de l'expression protéique des facteurs de transcription liés à l'induction d'une réponse T_H1 et T_H17, mais pas de ceux liés aux réponses T_H2 et T_{Reg}. Ceci est intéressant puisque le TGF-β est normalement impliqué dans la différenciation et les fonctions des cellules T régulatrices. Toutefois, il a été démontré que l'expression des micro-ARN est altérée dans les cellules T CD4⁺ naïves de patients atteints de la SEP (De Santis et al. 2010) et que certains de ces micro-ARN peuvent cibler la voie de signalisation du TGF-β, ce qui affecte le développement et la fonction des cellules T régulatrices (Lee, Severin, and Lovett-Racke 2017; Severin et al. 2016). L'expression de CD70 sur les cellules T CD4⁺ stimulées avec du TGF-β semble donc entraîner l'apparition d'un phénotype de cellules T_H1 et T_H17 pro-inflammatoires similaire à celui observé chez les patients atteints de la SEP et non pas un profil de cellules T_{reg} comme on pourrait s'y attendre. Ainsi donc, la liaison du CD27 soluble au CD70 se trouvant à la surface des cellules T CD4⁺ favorise la différenciation en lymphocytes aux caractéristiques pro-inflammatoires. La prochaine étape serait d'effectuer un essai de migration avec des cellules ayant été incubées en présence de CD27 soluble, afin de voir si la migration à travers les CEBHE et la production de cytokines pro-inflammatoire sont augmentées. Il serait aussi intéressant d'investiguer la possibilité d'une liaison CD70-CD70, puisque cette protéine est exprimée sur plusieurs types cellulaires, notamment au niveau des cellules T, des cellules présentatrices d'antigènes, des CEBHE, mais aussi des cellules B.

Pour la suite des choses, il sera important d'investiguer le rôle fonctionnel de la voie costimulatrice CD27/CD70 *in vivo*. Diverses expériences pourraient être effectuées à l'aide d'un modèle murin de la SEP. Par exemple, l'EAE pourrait être induite chez des souris transgéniques

dans lesquelles un KO est effectué spécifiquement au niveau de l'expression de CD70 sur les cellules T CD4⁺. Il serait donc possible de déterminer s'il y a effectivement une diminution des symptômes, de l'inflammation et de la transmigration à travers la BHE chez ces souris comparativement à des souris de type sauvage. Ainsi, la réalisation d'expériences *in vivo* est essentielle afin de déterminer le rôle exact qu'exerce CD70 à la surface des cellules T CD4⁺. Nous pensons que CD70 représente une cible particulièrement intéressante dans le contexte de la SEP puisque son expression est associée aux lymphocytes pro-inflammatoires pouvant infiltrer le SNC. Ainsi, nous pensons qu'il s'agit d'un marqueur d'activation immunitaire fiable dans le contexte de maladies inflammatoires chroniques.

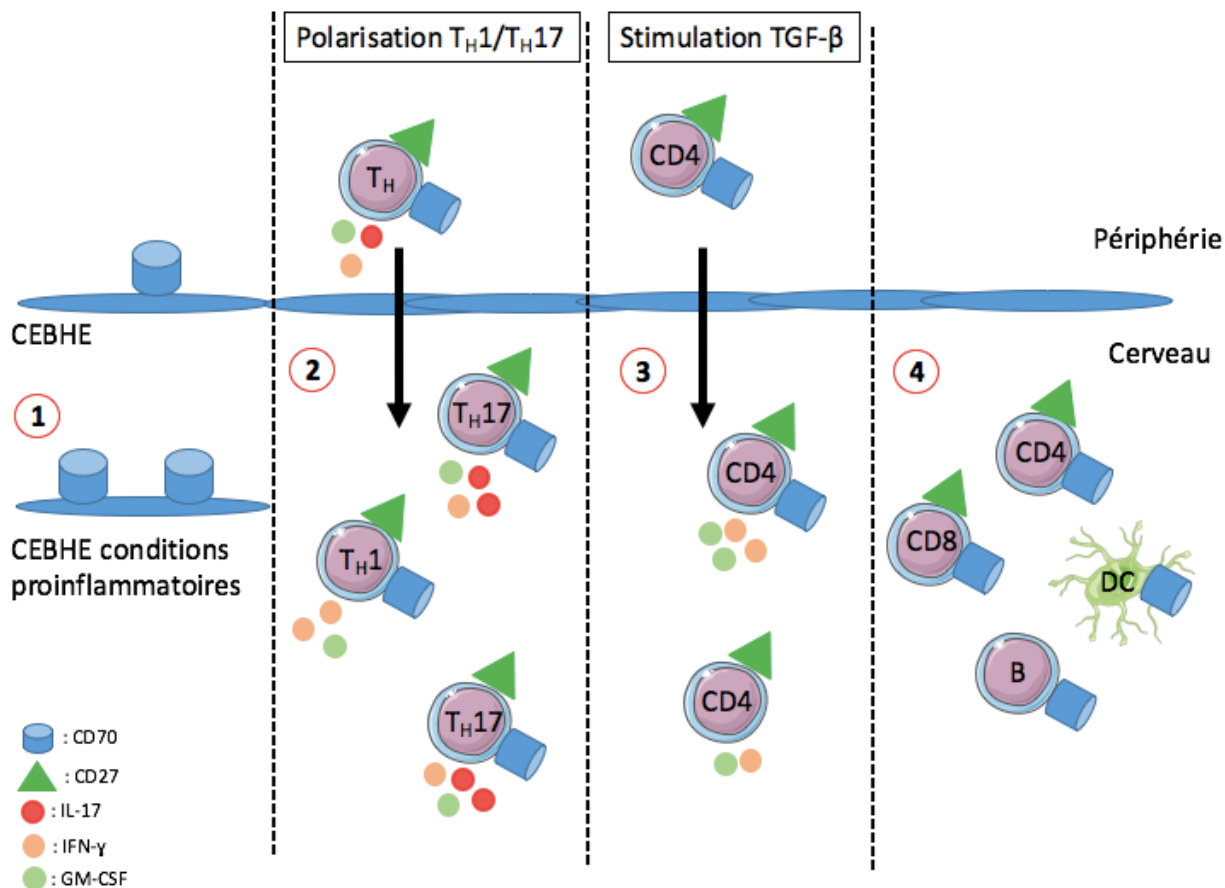


Figure 32. La voie costimulatrice CD27/CD70 est impliquée dans la réponse inflammatoire dans le contexte de la sclérose en plaques

(1) CD70 est exprimé sur les CEBHE et son expression est augmentée en condition de culture pro-inflammatoire. (2) Les cellules T_H $CD70^+$ présentent un profil inflammatoire après leur migration à travers les CEBHE, produisant des cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-17 et le GM-CSF. Les cellules T_H 17 migrent davantage à travers les CEBHE que les cellules T_H 1. (3) La stimulation des cellules T $CD4^+$ *in vitro* avec du TGF- β , augmente la production de cytokines par les cellules $CD70^+$ ayant migré à travers les CEBHE. (4) CD70 est exprimé sur différents sous-types de cellules immunitaires dans le SNC de patients atteints de la SEP, notamment les cellules T $CD4^+$, $CD8^+$, les cellules B et les cellules dendritiques (DC).

Conclusion

En définitive, la voie costimulatrice CD27/CD70 est impliquée dans la réponse inflammatoire dans le contexte de la sclérose en plaques. En effet, il a été possible de démontrer que l'expression de CD70 sur les CEBHE est augmentée en condition de culture pro-inflammatoire et que la forme soluble de CD70 est présente dans le LCR, mais pas dans le sérum, des patients atteints de la SEP. Bien que l'expression de CD70 ne semble pas affecter le potentiel migratoire des cellules T CD4⁺, les lymphocytes T CD70⁺ présentent un profil nettement plus pro-inflammatoire que leurs homologues CD70⁻ suite à leur transmigration à travers les CEBHE. De plus, des leucocytes CD70⁺ sont présents dans les lésions du SNC de patients atteints de la SEP. Finalement, l'ajout de CD27 soluble pouvant se lier au CD70 se trouvant à la surface des cellules T CD4⁺ favorise la différenciation en lymphocytes aux caractéristiques pro-inflammatoires. CD70 est donc un marqueur fiable de la maladie active, son expression étant associée à des cellules au phénotype pro-inflammatoire pouvant migrer à travers la BHE et se retrouver dans les lésions du cerveau de patients atteints de la SEP. Puisque différents types de cellules immunitaires expriment CD70, il serait intéressant d'étudier l'impact de leur déplétion sur l'activation du système immunitaire et la réponse inflammatoire générée dans le contexte de la sclérose en plaques.

Annexe

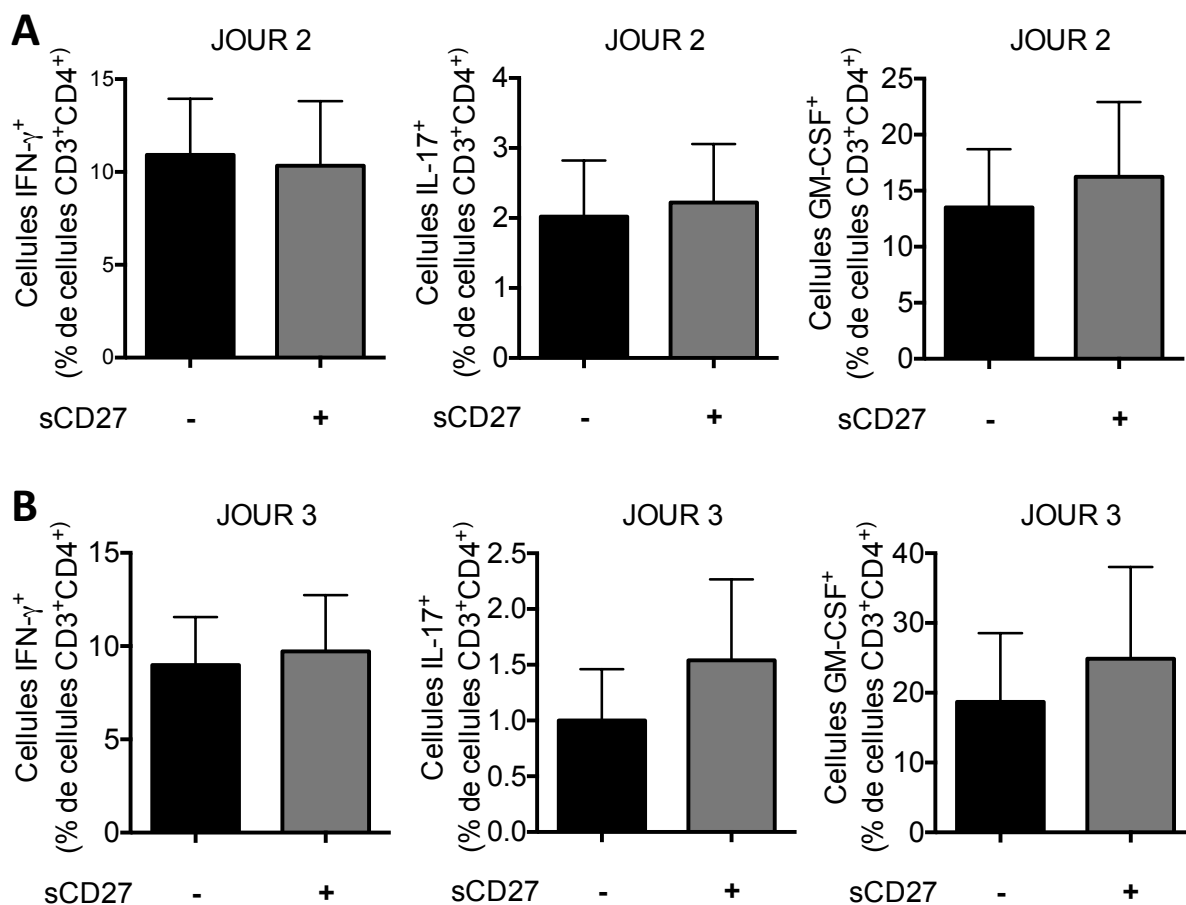


Figure 33. Production d'IFN- γ , d'IL-17 et de GM-CSF par les cellules T CD3⁺CD4⁺ après 5 jours de stimulation avec du TGF- β en présence ou absence de CD27 soluble pendant deux ou trois jours.

Pourcentage de cellules T CD3⁺CD4⁺ produisant de l'IFN- γ ⁺, de l'IL-17⁺ et du GM-CSF⁺, mesurée par cytométrie en flux, après 5 jours de stimulation avec du TGF- β en présence de CD27 soluble (8ng/mL) ou pas, pendant (A) 2 jours et (B) 3 jours pour n=6 sujets sains.

Bibliographie

- Agematsu, K. 2000. 'Memory B cells and CD27', *Histol Histopathol*, 15: 573-6.
- Agius, M., X. Meng, P. Chin, A. Grinspan, and R. Hashmonay. 2014. 'Fingolimod therapy in early multiple sclerosis: an efficacy analysis of the TRANSFORMS and FREEDOMS studies by time since first symptom', *CNS Neurosci Ther*, 20: 446-51.
- Aharoni, R. 2013. 'The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond', *Autoimmun Rev*, 12: 543-53.
- Akiba, H., H. Nakano, S. Nishinaka, M. Shindo, T. Kobata, M. Atsuta, C. Morimoto, C. F. Ware, N. L. Malinin, D. Wallach, H. Yagita, and K. Okumura. 1998. 'CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase', *J Biol Chem*, 273: 13353-8.
- Alvarez, J. I., R. Cayrol, and A. Prat. 2011. 'Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis', *Biochim Biophys Acta*, 1812: 252-64.
- Antel, J., S. Antel, Z. Caramanos, D. L. Arnold, and T. Kuhlmann. 2012. 'Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity?', *Acta Neuropathol*, 123: 627-38.
- Arens, R., M. A. Nolte, K. Tesselaar, B. Heemskerk, K. A. Reedquist, R. A. van Lier, and M. H. van Oers. 2004. 'Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production', *J Immunol*, 173: 3901-8.
- Arens, R., K. Tesselaar, P. A. Baars, G. M. van Schijndel, J. Hendriks, S. T. Pals, P. Krimpenfort, J. Borst, M. H. van Oers, and R. A. van Lier. 2001. 'Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFNgamma-mediated B cell depletion', *Immunity*, 15: 801-12.
- Atarashi, K., J. Nishimura, T. Shima, Y. Umesaki, M. Yamamoto, M. Onoue, H. Yagita, N. Ishii, R. Evans, K. Honda, and K. Takeda. 2008. 'ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation', *Nature*, 455: 808-12.
- Awankhah, N. Marrie, R.A. Bancej, C. Ganer, R. Manuel, D.G. Wall, R. Bernier, J. Tu. K. Reimer, K. . 2017. "La sclérose en plaques au Canada, 2011-2031 : résultats d'une

étude de modélisation par microsimulation des répercussions épidémiologiques et économiques." In, edited by Agence de Santé publique du Canada PSPMC, 13.

- Baecher-Allan, C., B. J. Kaskow, and H. L. Weiner. 2018. 'Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy', *Neuron*, 97: 742-68.
- Baeke, F., T. Takiishi, H. Korf, C. Gysemans, and C. Mathieu. 2010. 'Vitamin D: modulator of the immune system', *Curr Opin Pharmacol*, 10: 482-96.
- Beecham, A. H., N. A. Patsopoulos, D. K. Xifara, M. F. Davis, A. Kempainen, C. Cotsapas, T. S. Shah, C. Spencer, D. Booth, A. Goris, A. Oturai, J. Saarela, B. Fontaine, B. Hemmer, C. Martin, F. Zipp, S. D'Alfonso, F. Martinelli-Boneschi, B. Taylor, H. F. Harbo, I. Kockum, J. Hillert, T. Olsson, M. Ban, J. R. Oksenberg, R. Hintzen, L. F. Barcellos, C. Agliardi, L. Alfredsson, M. Alizadeh, C. Anderson, R. Andrews, H. B. Sondergaard, A. Baker, G. Band, S. E. Baranzini, N. Barizzone, J. Barrett, C. Bellenguez, L. Bergamaschi, L. Bernardinelli, A. Berthele, V. Biberacher, T. M. Binder, H. Blackburn, I. L. Bomfim, P. Brambilla, S. Broadley, B. Brochet, L. Brundin, D. Buck, H. Butzkueven, S. J. Caillier, W. Camu, W. Carpentier, P. Cavalla, E. G. Celius, I. Coman, G. Comi, L. Corrado, L. Cosemans, I. Cournu-Rebeix, B. A. Cree, D. Cusi, V. Damotte, G. Defer, S. R. Delgado, P. Deloukas, A. di Sapio, A. T. Dilthey, P. Donnelly, B. Dubois, M. Duddy, S. Edkins, I. Elovaara, F. Esposito, N. Evangelou, B. Fiddes, J. Field, A. Franke, C. Freeman, I. Y. Frohlich, D. Galimberti, C. Gieger, P. A. Gourraud, C. Graetz, A. Graham, V. Grummel, C. Guaschino, A. Hadjixenofontos, H. Hakonarson, C. Halfpenny, G. Hall, P. Hall, A. Hamsten, J. Harley, T. Harrower, C. Hawkins, G. Hellenthal, C. Hillier, J. Hobart, M. Hoshi, S. E. Hunt, M. Jagodic, I. Jelcic, A. Jochim, B. Kendall, A. Kermode, T. Kilpatrick, K. Koivisto, I. Konidari, T. Korn, H. Kronsbein, C. Langford, M. Larsson, M. Lathrop, C. Lebrun-Frenay, J. Lechner-Scott, M. H. Lee, M. A. Leone, V. Leppa, G. Liberatore, B. A. Lie, C. M. Lill, M. Linden, J. Link, F. Luessi, J. Lycke, F. Macchiardi, S. Mannisto, C. P. Manrique, R. Martin, V. Martinelli, D. Mason, G. Mazibrada, C. McCabe, I. L. Mero, J. Mescheriakova, L. Moutsianas, K. M. Myhr, G. Nagels, R. Nicholas, P. Nilsson, F. Piehl, M. Pirinen, S. E. Price, H. Quach, M. Reunanen, W. Robberecht, N. P. Robertson, M. Rodegher, D. Rog, M. Salvetti, N. C. Schnetz-Boutaud, F. Sellebjerg, R. C. Selter, C. Schaefer, S. Shaunak, L. Shen, S. Shields, V. Siffrin, M. Slee, P. S.

- Sorensen, M. Sorosina, M. Sospedra, A. Spurkland, A. Strange, E. Sundqvist, V. Thijs, J. Thorpe, A. Ticca, P. Tienari, C. van Duijn, E. M. Visser, S. Vucic, H. Westerlind, J. S. Wiley, A. Wilkins, J. F. Wilson, J. Winkelmann, J. Zajicek, E. Zindler, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, A. J. Iverson, G. Stewart, D. Hafler, S. L. Hauser, A. Compston, G. McVean, P. De Jager, S. J. Sawcer, and J. L. McCauley. 2013. 'Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis', *Nat Genet*, 45: 1353-60.
- Belbasis, L., V. Bellou, E. Evangelou, J. P. Ioannidis, and I. Tzoulaki. 2015. 'Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses', *Lancet Neurol*, 14: 263-73.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. 'Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells', *Nature*, 441: 235-8.
- Bo, L., J. W. Peterson, S. Mork, P. A. Hoffman, W. M. Gallatin, R. M. Ransohoff, and B. D. Trapp. 1996. 'Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions', *J Neuropathol Exp Neurol*, 55: 1060-72.
- Borst, J., J. Hendriks, and Y. Xiao. 2005. 'CD27 and CD70 in T cell and B cell activation', *Curr Opin Immunol*, 17: 275-81.
- Cannons, J. L., Y. Choi, and T. H. Watts. 2000. 'Role of TNF receptor-associated factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB-dependent immune response', *J Immunol*, 165: 6193-204.
- Canto, E., and J. R. Oksenberg. 2018. 'Multiple sclerosis genetics', *Mult Scler*, 24: 75-79.
- Chastain, E. M., D. S. Duncan, J. M. Rodgers, and S. D. Miller. 2011. 'The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis', *Biochim Biophys Acta*, 1812: 265-74.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. 'Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3', *J Exp Med*, 198: 1875-86.
- Chui, R., and K. Dorovini-Zis. 2010. 'Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide', *J Neuroinflammation*, 7: 1.

- Ciotti, J. R., and A. H. Cross. 2018. 'Disease-Modifying Treatment in Progressive Multiple Sclerosis', *Curr Treat Options Neurol*, 20: 12.
- Codarri, L., M. Greter, and B. Becher. 2013. 'Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease', *Trends Immunol*, 34: 114-9.
- Compston, A., and A. Coles. 2008. 'Multiple sclerosis', *Lancet*, 372: 1502-17.
- Coquet, J. M., S. Middendorp, G. van der Horst, J. Kind, E. A. Veraar, Y. Xiao, H. Jacobs, and J. Borst. 2013. 'The CD27 and CD70 costimulatory pathway inhibits effector function of T helper 17 cells and attenuates associated autoimmunity', *Immunity*, 38: 53-65.
- Coquet, J. M., J. C. Ribot, N. Babala, S. Middendorp, G. van der Horst, Y. Xiao, J. F. Neves, D. Fonseca-Pereira, H. Jacobs, D. J. Pennington, B. Silva-Santos, and J. Borst. 2013. 'Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4+Foxp3+ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway', *J Exp Med*, 210: 715-28.
- Cormary, C., R. Gonzalez, J. C. Faye, G. Favre, and A. F. Tilkin-Mariame. 2004. 'Induction of T-cell antitumor immunity and protection against tumor growth by secretion of soluble human CD70 molecules', *Cancer Gene Ther*, 11: 497-507.
- Correale, J., M. C. Ysraelit, and M. I. Gaitan. 2009. 'Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis', *Brain*, 132: 1146-60.
- Croft, M. 2003. 'Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?', *Nat Rev Immunol*, 3: 609-20.
- . 2009. 'The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases', *Nat Rev Immunol*, 9: 271-85.
- Daneman, R., and A. Prat. 2015. 'The blood-brain barrier', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a020412.
- De Santis, G., M. Ferracin, A. Biondani, L. Caniatti, M. Rosaria Tola, M. Castellazzi, B. Zagatti, L. Battistini, G. Borsellino, E. Fainardi, R. Gavioli, M. Negrini, R. Furlan, and E. Granieri. 2010. 'Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis', *J Neuroimmunol*, 226: 165-71.
- Dendrou, Calliope A., Lars Fugger, and Manuel A. Friese. 2015. 'Immunopathology of multiple sclerosis', *Nat Rev Immunol*, 15: 545-58.

- Dhainaut, M., C. Coquerelle, S. Uzureau, J. Denoeud, V. Acolty, G. Oldenhove, A. Galuppo, T. Sparwasser, K. Thielemans, E. Pays, H. Yagita, J. Borst, and M. Moser. 2015. 'Thymus-derived regulatory T cells restrain pro-inflammatory Th1 responses by downregulating CD70 on dendritic cells', *Embo j*, 34: 1336-48.
- Dhib-Jalbut, S., and S. Marks. 2010. 'Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis', *Neurology*, 74 Suppl 1: S17-24.
- Dobson, R., S. Ramagopalan, A. Davis, and G. Giovannoni. 2013. 'Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84: 909-14.
- Dragunow, M. 2013. 'Meningeal and choroid plexus cells--novel drug targets for CNS disorders', *Brain Res*, 1501: 32-55.
- Duggleby, R. C., T. N. Shaw, L. B. Jarvis, G. Kaur, and J. S. Gaston. 2007. 'CD27 expression discriminates between regulatory and non-regulatory cells after expansion of human peripheral blood CD4+ CD25+ cells', *Immunology*, 121: 129-39.
- Dutta, R., J. McDonough, X. Yin, J. Peterson, A. Chang, T. Torres, T. Gudz, W. B. Macklin, D. A. Lewis, R. J. Fox, R. Rudick, K. Mirnics, and B. D. Trapp. 2006. 'Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients', *Ann Neurol*, 59: 478-89.
- Engelhardt, B. 2008. 'The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system', *Curr Pharm Des*, 14: 1555-65.
- Engelhardt, B., and R. M. Ransohoff. 2012. 'Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers', *Trends Immunol*, 33: 579-89.
- Fletcher, J. M., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, N. Tubridy, and K. H. Mills. 2010. 'T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis', *Clin Exp Immunol*, 162: 1-11.
- Francosalinas, G., T. Cantaert, M. A. Nolte, P. P. Tak, R. A. van Lier, and D. L. Baeten. 2013. 'Enhanced costimulation by CD70+ B cells aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in autoimmune mice', *J Neuroimmunol*, 255: 8-17.

- Fraussen, J., K. Vrolix, P. Martinez-Martinez, M. Losen, M. H. De Baets, P. Stinissen, and V. Somers. 2009. 'B cell characterization and reactivity analysis in multiple sclerosis', *Autoimmun Rev*, 8: 654-8.
- Frisullo, G., M. Mirabella, F. Angelucci, M. Caggiula, R. Morosetti, C. Sancricca, A. K. Patanella, V. Nociti, R. Iorio, A. Bianco, V. Tomassini, C. Pozzilli, P. A. Tonali, G. Matarese, and A. P. Batocchi. 2007. 'The effect of disease activity on leptin, leptin receptor and suppressor of cytokine signalling-3 expression in relapsing-remitting multiple sclerosis', *J Neuroimmunol*, 192: 174-83.
- Garcia, P., A. B. De Heredia, T. Bellon, E. Carpio, M. Llano, E. Caparros, P. Aparicio, and M. Lopez-Botet. 2004. 'Signalling via CD70, a member of the TNF family, regulates T cell functions', *J Leukoc Biol*, 76: 263-70.
- Goldenberg, M. M. 2012. 'Multiple sclerosis review', *P t*, 37: 175-84.
- Gorelik, L., S. Constant, and R. A. Flavell. 2002. 'Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation', *J Exp Med*, 195: 1499-505.
- Gray, E., T. L. Thomas, S. Betmouni, N. Scolding, and S. Love. 2008. 'Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis', *Neurosci Lett*, 444: 195-8.
- Greenwood, J., S. J. Heasman, J. I. Alvarez, A. Prat, R. Lyck, and B. Engelhardt. 2011. 'Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37: 24-39.
- Grigoriadis, N., and V. van Pesch. 2015. 'A basic overview of multiple sclerosis immunopathology', *Eur J Neurol*, 22 Suppl 2: 3-13.
- Hagan, N., and A. Ben-Zvi. 2015. 'The molecular, cellular, and morphological components of blood-brain barrier development during embryogenesis', *Semin Cell Dev Biol*, 38: 7-15.
- Han, B. K., N. J. Olsen, and A. Bottaro. 2016. 'The CD27-CD70 pathway and pathogenesis of autoimmune disease', *Semin Arthritis Rheum*, 45: 496-501.
- Han, B. K., A. M. White, K. H. Dao, D. R. Karp, E. K. Wakeland, and L. S. Davis. 2005. 'Increased prevalence of activated CD70+CD4+ T cells in the periphery of patients with systemic lupus erythematosus', *Lupus*, 14: 598-606.

- Handel, A. E., A. J. Williamson, G. Disanto, R. Dobson, G. Giovannoni, and S. V. Ramagopalan. 2011. 'Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis', *PLoS One*, 6: e16149.
- Haorah, J., B. Knipe, J. Leibhart, A. Ghorpade, and Y. Persidsky. 2005. 'Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction', *J Leukoc Biol*, 78: 1223-32.
- Hart, Prue H., Shelley Gorman, and John J. Finlay-Jones. 2011. 'Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?', *Nat Rev Immunol*, 11: 584-96.
- Hashimoto-Okada, M., T. Kitawaki, N. Kadowaki, S. Iwata, C. Morimoto, T. Hori, and T. Uchiyama. 2009. 'The CD70-CD27 interaction during the stimulation with dendritic cells promotes naive CD4(+) T cells to develop into T cells producing a broad array of immunostimulatory cytokines in humans', *Int Immunol*, 21: 891-904.
- Hayakawa, Y., and M. J. Smyth. 2006. 'CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity', *J Immunol*, 176: 1517-24.
- Hedstrom, A. K., J. Hillert, T. Olsson, and L. Alfredsson. 2013. 'Smoking and multiple sclerosis susceptibility', *Eur J Epidemiol*, 28: 867-74.
- Hedstrom, A. K., I. Lima Bomfim, L. Barcellos, M. Gianfrancesco, C. Schaefer, I. Kockum, T. Olsson, and L. Alfredsson. 2014. 'Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis', *Neurology*, 82: 865-72.
- Hernan, M. A., S. S. Jick, G. Logroscino, M. J. Olek, A. Ascherio, and H. Jick. 2005. 'Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis', *Brain*, 128: 1461-5.
- Hintzen, R. Q., S. M. Lens, G. Koopman, S. T. Pals, H. Spits, and R. A. van Lier. 1994. 'CD70 represents the human ligand for CD27', *Int Immunol*, 6: 477-80.
- Hintzen, R. Q., S. M. Lens, K. Lammers, H. Kuiper, M. P. Beckmann, and R. A. van Lier. 1995. 'Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation', *J Immunol*, 154: 2612-23.
- Hirota, K., J. H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D. J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garefalaki, A. J. Potocnik, and B. Stockinger. 2011. 'Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses', *Nat Immunol*, 12: 255-63.

- Hollenbach, J. A., and J. R. Oksenberg. 2015. 'The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review', *J Autoimmun*, 64: 13-25.
- Holman, D. W., R. S. Klein, and R. M. Ransohoff. 2011. 'The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis', *Biochim Biophys Acta*, 1812: 220-30.
- Huber, M., S. Heink, A. Pagenstecher, K. Reinhard, J. Ritter, A. Visekruna, A. Guralnik, N. Bollig, K. Jeltsch, C. Heinemann, E. Wittmann, T. Buch, O. Prazeres da Costa, A. Brustle, D. Brenner, T. W. Mak, H. W. Mittrucker, B. Tackenberg, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2013. 'IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis', *J Clin Invest*, 123: 247-60.
- Huynh, J. L., and P. Casaccia. 2013. 'Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment', *Lancet Neurol*, 12: 195-206.
- Ifergan, I., H. Kebir, J. I. Alvarez, G. Marceau, M. Bernard, L. Bourbonniere, J. Poirier, P. Duquette, P. J. Talbot, N. Arbour, and A. Prat. 2011. 'Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin', *Brain*, 134: 3560-77.
- Jacobs, J., V. Deschoolmeester, K. Zwaenepoel, C. Rolfo, K. Silence, S. Rottey, F. Lardon, E. Smits, and P. Pauwels. 2015. 'CD70: An emerging target in cancer immunotherapy', *Pharmacol Ther*, 155: 1-10.
- Johnston, B., and E. C. Butcher. 2002. 'Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration', *Semin Immunol*, 14: 83-92.
- Jung, H. W., S. W. Choi, J. I. Choi, and B. S. Kwon. 2004. 'Serum concentrations of soluble 4-1BB and 4-1BB ligand correlated with the disease severity in rheumatoid arthritis', *Exp Mol Med*, 36: 13-22.
- Kaskow, B. J., and C. Baecher-Allan. 2018. 'Effector T Cells in Multiple Sclerosis', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- Kato, K., P. Chu, S. Takahashi, H. Hamada, and T. J. Kipps. 2007. 'Metalloprotease inhibitors block release of soluble CD27 and enhance the immune stimulatory activity of chronic lymphocytic leukemia cells', *Exp Hematol*, 35: 434-42.
- Keaney, J., and M. Campbell. 2015. 'The dynamic blood-brain barrier', *Febs j*, 282: 4067-79.

- Kebir, H., I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, and A. Prat. 2009. 'Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis', *Ann Neurol*, 66: 390-402.
- Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, and A. Prat. 2007. 'Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation', *Nat Med*, 13: 1173-5.
- Kieseier, B. C. 2011. 'The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis', *CNS Drugs*, 25: 491-502.
- Koch, M. W., L. M. Metz, and O. Kovalchuk. 2013. 'Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis', *Nat Rev Neurol*, 9: 35-43.
- Komori, M., A. Blake, M. Greenwood, Y. C. Lin, P. Kosa, D. Ghazali, P. Winokur, M. Natrajan, S. C. Wuest, E. Romm, A. A. Panackal, P. R. Williamson, T. Wu, and B. Bielekova. 2015. 'Cerebrospinal fluid markers reveal intrathecal inflammation in progressive multiple sclerosis', *Ann Neurol*, 78: 3-20.
- Larochelle, C., J. I. Alvarez, and A. Prat. 2011. 'How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?', *FEBS Lett*, 585: 3770-80.
- Larochelle, C., R. Cayrol, H. Kebir, J. I. Alvarez, M. A. Lecuyer, I. Ifergan, E. Viel, L. Bourbonniere, D. Beauseigle, S. Terouz, L. Hachehouche, S. Gendron, J. Poirier, C. Jobin, P. Duquette, K. Flanagan, T. Yednock, N. Arbour, and A. Prat. 2012. 'Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system', *Brain*, 135: 2906-24.
- Larochelle, C., M. A. Lecuyer, J. I. Alvarez, M. Charabati, O. Saint-Laurent, S. Ghannam, H. Kebir, K. Flanagan, T. Yednock, P. Duquette, N. Arbour, and A. Prat. 2015. 'Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation', *Ann Neurol*, 78: 39-53.
- Lee, P. W., M. E. Severin, and A. E. Lovett-Racke. 2017. 'TGF-beta regulation of encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis', *Eur J Immunol*, 47: 446-53.
- Legroux, L., and N. Arbour. 2015. 'Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story', *J Neuroimmune Pharmacol*, 10: 528-46.

- Lemus, H. N., A. E. Warrington, and M. Rodriguez. 2018. 'Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair', *Neurol Clin*, 36: 1-11.
- Lens, S. M., K. Tesselaar, M. H. van Oers, and R. A. van Lier. 1998. 'Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions', *Semin Immunol*, 10: 491-9.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. 'Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated', *Nat Rev Immunol*, 7: 678-89.
- Li, Y., N. Chu, A. Hu, B. Gran, A. Rostami, and G. X. Zhang. 2007. 'Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia', *Brain*, 130: 490-501.
- Link, H. 1998. 'The cytokine storm in multiple sclerosis', *Mult Scler*, 4: 12-5.
- Liu, G. Z., A. C. Gomes, P. Putheti, V. Karrenbauer, K. Kostulas, R. Press, J. Hillert, P. Hjelmstrom, and X. G. Gao. 2006. 'Increased soluble 4-1BB ligand (4-1BBL) levels in peripheral blood of patients with multiple sclerosis', *Scand J Immunol*, 64: 412-9.
- Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. 'The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology', *Cell*, 104: 487-501.
- Loenen, W. A., E. De Vries, L. A. Gravestein, R. Q. Hintzen, R. A. Van Lier, and J. Borst. 1992. 'The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis', *Eur J Immunol*, 22: 447-55.
- Loma, I., and R. Heyman. 2011. 'Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment', *Curr Neuropharmacol*, 9: 409-16.
- Lossius, A., J. N. Johansen, F. Vartdal, H. Robins, B. Jurate Saltyte, T. Holmoy, and J. Olweus. 2014. 'High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+ T cells', *Eur J Immunol*, 44: 3439-52.
- Louveau, A., T. H. Harris, and J. Kipnis. 2015. 'Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege', *Trends Immunol*, 36: 569-77.
- Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma, and B. Xia. 2012. 'CD4(+)T cells: differentiation and functions', *Clin Dev Immunol*, 2012: 925135.
- Magombedze, G., P. B. Reddy, S. Eda, and V. V. Ganusov. 2013. 'Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses', *Front Physiol*, 4: 206.

- Man, S., E. E. Ubogu, and R. M. Ransohoff. 2007. 'Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale', *Brain Pathol*, 17: 243-50.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. 'Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage', *Nature*, 441: 231-4.
- Manocha, M., S. Rietdijk, A. Laouar, G. Liao, A. Bhan, J. Borst, C. Terhorst, and N. Manjunath. 2009. 'Blocking CD27-CD70 costimulatory pathway suppresses experimental colitis', *J Immunol*, 183: 270-6.
- Michel, L., H. Touil, N. B. Pikor, J. L. Gommerman, A. Prat, and A. Bar-Or. 2015. 'B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation', *Front Immunol*, 6: 636.
- Miller, J., G. Eisele, G. Tabatabai, S. Aulwurm, G. von Kurthy, L. Stitz, P. Roth, and M. Weller. 2010. 'Soluble CD70: a novel immunotherapeutic agent for experimental glioblastoma', *J Neurosurg*, 113: 280-5.
- Milo, R., and A. Miller. 2014. 'Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis', *Autoimmun Rev*, 13: 518-24.
- Minagar, A., and J. S. Alexander. 2003. 'Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis', *Mult Scler*, 9: 540-9.
- Miron, V. E., T. Kuhlmann, and J. P. Antel. 2011. 'Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination', *Biochim Biophys Acta*, 1812: 184-93.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. 'RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes', *Cell*, 68: 869-77.
- Muller, W. A. 2003. 'Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response', *Trends Immunol*, 24: 327-34.
- Munger, K. L., L. I. Levin, B. W. Hollis, N. S. Howard, and A. Ascherio. 2006. 'Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis', *Jama*, 296: 2832-8.
- Munz, C., J. D. Lunemann, M. T. Getts, and S. D. Miller. 2009. 'Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity?', *Nat Rev Immunol*, 9: 246-58.
- Nakajima, Atsuo, Hideo Oshima, Chiyoko Nohara, Shinji Morimoto, Shin-ichi Yoshino, Tetsuji Kobata, Hideo Yagita, and Ko Okumura. 2000. 'Involvement of CD70-CD27

- interactions in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Neuroimmunology*, 109: 188-96.
- Nuyts, A. H., W. P. Lee, R. Bashir-Dar, Z. N. Berneman, and N. Cools. 2013. 'Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies?', *Mult Scler*, 19: 995-1002.
- O'Gorman, C., R. Lucas, and B. Taylor. 2012. 'Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms', *Int J Mol Sci*, 13: 11718-52.
- O'Neill, R. E., W. Du, H. Mohammadpour, E. Alqassim, J. Qiu, G. Chen, P. L. McCarthy, K. P. Lee, and X. Cao. 2017. 'T Cell-Derived CD70 Delivers an Immune Checkpoint Function in Inflammatory T Cell Responses', *J Immunol*, 199: 3700-10.
- Oflazoglu, E., T. E. Boursalian, W. Zeng, A. C. Edwards, S. Duniho, J. A. McEarchern, C. L. Law, H. P. Gerber, and I. S. Grewal. 2009. 'Blocking of CD27-CD70 pathway by anti-CD70 antibody ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis', *J Immunol*, 183: 3770-7.
- Operskalski, E. A., B. R. Visscher, R. M. Malmgren, and R. Detels. 1989. 'A case-control study of multiple sclerosis', *Neurology*, 39: 825-9.
- Ortiz, G. G., F. P. Pacheco-Moises, M. A. Macias-Islas, L. J. Flores-Alvarado, M. A. Mireles-Ramirez, E. D. Gonzalez-Renovato, V. E. Hernandez-Navarro, A. L. Sanchez-Lopez, and M. A. Alatorre-Jimenez. 2014. 'Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis', *Arch Med Res*, 45: 687-97.
- Palace, J. 2001. 'Making the diagnosis of multiple sclerosis', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71 Suppl 2: ii3-8.
- Palavra, F., L. Almeida, A. F. Ambrosio, and F. Reis. 2016. 'Obesity and brain inflammation: a focus on multiple sclerosis', *Obes Rev*, 17: 211-24.
- Panitch, H. S., R. L. Hirsch, A. S. Haley, and K. P. Johnson. 1987. 'Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon', *Lancet*, 1: 893-5.
- Park, J. K., B. K. Han, J. A. Park, Y. J. Woo, S. Y. Kim, E. Y. Lee, E. B. Lee, P. Chalan, A. M. Boots, and Y. W. Song. 2014. 'CD70-expressing CD4 T cells produce IFN-gamma and IL-17 in rheumatoid arthritis', *Rheumatology (Oxford)*, 53: 1896-900.

- Parsa, Roham, Harald Lund, Ivana Tosevski, Xing-Mei Zhang, Ursula Malipiero, Jan Beckervordersandforth, Doron Merkler, Marco Prinz, Alexandra Gyllenberg, Tojo James, Andreas Warnecke, Jan Hillert, Lars Alfredsson, Ingrid Kockum, Tomas Olsson, Adriano Fontana, Tobias Suter, and Robert A. Harris. 2016. 'TGF β regulates persistent neuroinflammation by controlling Th1 polarization and ROS production via monocyte-derived dendritic cells', *Glia*, 64: 1925-37.
- Pen, J. J., B. De Keersmaecker, S. K. Maenhout, A. M. Van Nuffel, C. Heirman, J. Corthals, D. Escors, A. Bonehill, K. Thielemans, K. Breckpot, and J. L. Aerts. 2013. 'Modulation of regulatory T cell function by monocyte-derived dendritic cells matured through electroporation with mRNA encoding CD40 ligand, constitutively active TLR4, and CD70', *J Immunol*, 191: 1976-83.
- Pohar, S. L., C. A. Jones, S. Warren, K. V. Turpin, and K. Warren. 2007. 'Health status and health care utilization of multiple sclerosis in Canada', *Can J Neurol Sci*, 34: 167-74.
- Polman, C. H., P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, and A. W. Sandrock. 2006. 'A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis', *N Engl J Med*, 354: 899-910.
- Prat, A., K. Biernacki, J. F. Lavoie, J. Poirier, P. Duquette, and J. P. Antel. 2002. 'Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium', *Arch Neurol*, 59: 391-7.
- Prat, A., K. Biernacki, S. Pouly, J. Nalbantoglu, R. Couture, and J. P. Antel. 2000. 'Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells', *J Neuropathol Exp Neurol*, 59: 896-906.
- Pratt, B. M., and J. M. McPherson. 1997. 'TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases', *Cytokine Growth Factor Rev*, 8: 267-92.
- Prins, M., E. Schul, J. Geurts, P. van der Valk, B. Drukarch, and A. M. van Dam. 2015. 'Pathological differences between white and grey matter multiple sclerosis lesions', *Ann N Y Acad Sci*, 1351: 99-113.
- Pun, P. B., J. Lu, and S. Moochhala. 2009. 'Involvement of ROS in BBB dysfunction', *Free Radic Res*, 43: 348-64.

- Reiber, H. 2016. 'Cerebrospinal fluid data compilation and knowledge-based interpretation of bacterial, viral, parasitic, oncological, chronic inflammatory and demyelinating diseases. Diagnostic patterns not to be missed in neurology and psychiatry', *Arq Neuropsiquiatr*, 74: 337-50.
- Reiber, H., S. Ungefehr, and C. Jacobi. 1998. 'The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis', *Mult Scler*, 4: 111-7.
- Reich, D. S., C. F. Lucchinetti, and P. A. Calabresi. 2018. 'Multiple Sclerosis', *N Engl J Med*, 378: 169-80.
- Riou, C. 2007. 'Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4(+) central memory T cells', 204: 79-91.
- Rostami, A., and B. Ciric. 2013. 'Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination', *J Neurol Sci*, 333: 76-87.
- Runia, T. F., E. D. van Pelt-Gravesteijn, and R. Q. Hintzen. 2012. 'Recent gains in clinical multiple sclerosis research', *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11: 497-505.
- Ruprecht, C. R., M. Gattorno, F. Ferlito, A. Gregorio, A. Martini, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2005. 'Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia', *J Exp Med*, 201: 1793-803.
- Sawcer, S., G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt, S. Edkins, E. Gray, D. R. Booth, S. C. Potter, A. Goris, G. Band, A. B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp, A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. Martinelli Boneschi, J. Liddle, H. F. Harbo, M. L. Perez, A. Spurkland, M. J. Waller, M. P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O. T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kempainen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S. J. Bumpstead, L. F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S. E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J. P. Bradfield, D. Brassat, S. A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W. M. Carroll, P. Cavalla, E. G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M.

Cosburn, I. Cournu-Rebeix, M. B. Cox, W. Cozen, B. A. Cree, A. H. Cross, D. Cusi, M. J. Daly, E. Davis, P. I. de Bakker, M. Debouverie, B. D'Hooghe M, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S. F. Grant, F. R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H. P. Hartung, R. N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A. G. Kermod, T. J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J. S. Lechner-Scott, M. A. Leone, V. Leppa, U. Liljedahl, I. L. Bomfim, R. R. Lincoln, J. Link, J. Liu, A. R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macciardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J. L. McCauley, F. Mentch, I. L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K. M. Myhr, P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H. L. Quach, P. P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J. D. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J. P. Rubio, I. M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C. A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R. J. Scott, F. Sellebjerg, K. W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P. M. Sleiman, C. Smestad, P. S. Sorensen, H. B. Sondergaard, J. Stankovich, R. C. Strange, A. M. Sulonen, E. Sundqvist, A. C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor, J. M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah, M. A. Brown, E. Tronczynska, J. P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H. S. Markus, K. Wang, C. G. Mathew, J. Wason, C. N. Palmer, H. E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A. Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R. C. Trembath, J. Yaouanq, A. C. Viswanathan, H. Zhang, N. W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J. R. Oksenberg, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A. J. Ivinson, P. L. De Jager, L. Peltonen, G. J. Stewart, D. A. Hafler, S. L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly, and A. Compston. 2011. 'Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis', *Nature*, 476: 214-9.

Seko, Y., S. Ishiyama, T. Nishikawa, T. Kasajima, M. Hiroe, S. Suzuki, S. Ishiwata, S. Kawai, Y. Tanaka, M. Azuma, T. Kobata, H. Yagita, K. Okumura, and R. Nagai. 2002. 'Expression of tumor necrosis factor ligand superfamily costimulatory molecules

- CD27L, CD30L, OX40L and 4-1BBL in the heart of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy', *Cardiovasc Pathol*, 11: 166-70.
- Sethi, A., N. Kulkarni, S. Sonar, and G. Lal. 2013. 'Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance', *Front Genet*, 4.
- Severin, M. E., P. W. Lee, Y. Liu, A. J. Selhorst, M. G. Gormley, W. Pei, Y. Yang, M. Guerau-de-Arellano, M. K. Racke, and A. E. Lovett-Racke. 2016. 'MicroRNAs targeting TGFbeta signalling underlie the regulatory T cell defect in multiple sclerosis', *Brain*, 139: 1747-61.
- Sharief, M. K. 2002. 'Heightened intrathecal release of soluble CD137 in patients with multiple sclerosis', *Eur J Neurol*, 9: 49-54.
- Silva, A., D. M. Andrews, A. G. Brooks, M. J. Smyth, and Y. Hayakawa. 2008. 'Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets', *Int Immunol*, 20: 625-30.
- Sinha, S., A. W. Boyden, F. R. Itani, M. P. Crawford, and N. J. Karandikar. 2015. 'CD8(+) T-Cells as Immune Regulators of Multiple Sclerosis', *Front Immunol*, 6: 619.
- Smolders, J., S. M. Moen, J. Damoiseaux, I. Huitinga, and T. Holmoy. 2011. 'Vitamin D in the healthy and inflamed central nervous system: access and function', *J Neurol Sci*, 311: 37-43.
- Soares, H., H. Waechter, N. Glaichenhaus, E. Mougneau, H. Yagita, O. Mizenina, D. Dudziak, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2007. 'A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo', *J Exp Med*, 204: 1095-106.
- Souza, H. S., C. C. Elia, J. Spencer, and T. T. MacDonald. 1999. 'Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease', *Gut*, 45: 856-63.
- Speck, S., J. Lim, S. Shelake, M. Matka, J. Stoddard, A. Farr, V. Kuchroo, and Y. Laouar. 2014. 'TGF-beta signaling initiated in dendritic cells instructs suppressive effects on Th17 differentiation at the site of neuroinflammation', *PLoS One*, 9: e102390.
- Spencer, J. I., J. S. Bell, and G. C. DeLuca. 2018. 'Vascular pathology in multiple sclerosis: reframing pathogenesis around the blood-brain barrier', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 89: 42-52.

- Takeshita, Y., and R. M. Ransohoff. 2012. 'Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models', *Immunol Rev*, 248: 228-39.
- Thompson, A. J., B. L. Banwell, F. Barkhof, W. M. Carroll, T. Coetzee, G. Comi, J. Correale, F. Fazekas, M. Filippi, M. S. Freedman, K. Fujihara, S. L. Galetta, H. P. Hartung, L. Kappos, F. D. Lublin, R. A. Marrie, A. E. Miller, D. H. Miller, X. Montalban, E. M. Mowry, P. S. Sorensen, M. Tintore, A. L. Traboulsee, M. Trojano, B. M. J. Uitdehaag, S. Vukusic, E. Waubant, B. G. Weinshenker, S. C. Reingold, and J. A. Cohen. 2018. 'Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria', *Lancet Neurol*, 17: 162-73.
- Torkildsen, O., K. M. Myhr, and L. Bo. 2016. 'Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications', *Eur J Neurol*, 23 Suppl 1: 18-27.
- Tzartos, J. S., M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri, and L. Fugger. 2008. 'Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis', *Am J Pathol*, 172: 146-55.
- Uitdehaag, B. M. 2014. 'Clinical outcome measures in multiple sclerosis', *Handb Clin Neurol*, 122: 393-404.
- van der Vuurst de Vries, R. M., J. Y. Mescheriakova, T. F. Runia, N. Jafari, T. A. Siepman, and R. Q. Hintzen. 2017. 'Soluble CD27 Levels in Cerebrospinal Fluid as a Prognostic Biomarker in Clinically Isolated Syndrome', *JAMA Neurol*, 74: 286-92.
- van Oosterwijk, M. F., H. Juwana, R. Arens, K. Tesselaar, M. H. van Oers, E. Eldering, and R. A. van Lier. 2007. 'CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development', *Int Immunol*, 19: 713-8.
- Venken, K., N. Hellings, M. Thewissen, V. Somers, K. Hensen, J. L. Rummens, R. Medaer, R. Hupperts, and P. Stinissen. 2008. 'Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level', *Immunology*, 123: 79-89.
- Wade, B. J. 2014. 'Spatial analysis of global prevalence of multiple sclerosis suggests need for an updated prevalence scale', *Mult Scler Int*, 2014: 124578.
- Wajant, H. 2016. 'Therapeutic targeting of CD70 and CD27', *Expert Opin Ther Targets*, 20: 959-73.

- Wang, X., and C. Dong. 2013. 'The CD70-CD27 axis, a new brake in the T helper 17 cell response', *Immunity*, 38: 1-3.
- Ward, M. D., D. E. Jones, and M. D. Goldman. 2014. 'Overview and safety of fingolimod hydrochloride use in patients with multiple sclerosis', *Expert Opin Drug Saf*, 13: 989-98.
- Ward-Kavanagh, L. K., W. W. Lin, J. R. Sedy, and C. F. Ware. 2016. 'The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses', *Immunity*, 44: 1005-19.
- Watts, T. H. 2005. 'TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses', *Annu Rev Immunol*, 23: 23-68.
- Willis, M. A., and J. A. Cohen. 2013. 'Fingolimod therapy for multiple sclerosis', *Semin Neurol*, 33: 37-44.
- Wyzgol, A., N. Muller, A. Fick, S. Munkel, G. U. Grigoleit, K. Pfizenmaier, and H. Wajant. 2009. 'Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand', *J Immunol*, 183: 1851-61.
- Yang, Z. Z., D. M. Grote, B. Xiu, S. C. Ziesmer, T. L. Price-Troska, L. S. Hodge, D. M. Yates, A. J. Novak, and S. M. Ansell. 2014. 'TGF-beta upregulates CD70 expression and induces exhaustion of effector memory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma', *Leukemia*, 28: 1872-84.
- Zhao, Z., A. R. Nelson, C. Betsholtz, and B. V. Zlokovic. 2015. 'Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier', *Cell*, 163: 1064-78.
- Ziemssen, T., and W. Schrempf. 2007. 'Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis', *Int Rev Neurobiol*, 79: 537-70.
- Zlokovic, B. V. 2008. 'The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders', *Neuron*, 57: 178-201.
- Zurawski, J., and J. Stankiewicz. 2017. 'Multiple Sclerosis Re-Examined: Essential and Emerging Clinical Concepts', *Am J Med*.