

Université de Montréal

**Développement d'un nouveau modèle de souris humanisée de sclérose en  
plaques.**

par Rose-Marie Rebillard

Faculté de médecine  
Département de Neurosciences

Mémoire présentée  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Neurosciences

Avril 2019

© Rose-Marie Rébillard, 2019

Université de Montréal  
Faculté de médecine, département de Neurosciences

*Ce mémoire intitulé*

**Développement d'un nouveau modèle de souris humanisée de sclérose en plaques.**

*Présenté par*

**Rose-Marie Rebillard**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Graziella Di Cristo**  
Président-rapporteur

**Alexandre Prat**  
Directeur de recherche

**Patrick Cossette**  
Codirecteur

**Martin Guimond**  
Membre du jury

## Résumé

Introduction: L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale est le modèle animal le plus utilisé pour l'étude de la sclérose en plaques (SEP). Ce modèle ne réplique pas avec exactitude toutes les caractéristiques de la maladie. Notre hypothèse est qu'il est possible de développer un modèle innovateur de souris humanisées de SEP qui reproduirait avec plus de fidélité la maladie. Ce type de modèle ouvrirait la voie à de nouvelles façons d'étudier la physiopathologie de la maladie et surtout permettrait le développement de nouvelles stratégies médicamenteuses.

Méthode: Des cellules mononucléées provenant du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*; PBMC) de patients atteints de SEP et de sujets sains ont été injectées par voie intrapéritonéale à des souris NOD/LtSz-scid IL-2Ryc(null) afin d'induire une reconstitution immune chez ces souris, laquelle a été évaluée par cytométrie en flux. Par la suite une caractérisation clinico-pathologique du modèle a été faite.

Résultats: Une reconstitution immune a été observée chez toutes nos souris ayant reçu des PBMC de patients atteints de SEP et de sujets sains. Les souris n'ont présenté aucune manifestation clinique suggérant une atteinte démyélinisante et l'histologie cérébrale a confirmé l'absence de démyélinisation. Des cellules immunitaires ont été isolées à partir du système nerveux central et leurs caractéristiques tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif n'ont pas permis de mettre en évidence une distinction entre le groupe ayant reçu les PBMC de patients atteints de SEP et celui ayant reçu les PBMC provenant des sujets sains.

Conclusion: L'injection par voie intrapéritonéale de PBMC provenant de patient atteints de SEP chez la souris NSG engendre une reconstitution immune chez la souris, sans que celle-ci ne développe de manifestation clinicopathologique suggérant une maladie s'apparentant à la SEP.

**Mots-clés :** Sclérose en plaques, encéphalomyélite auto-immune expérimentale, souris humanisée, souris NSG.

## **Abstract**

Introduction: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a widely used animal model for the study of multiple sclerosis (MS). Although instrumental in MS research, this model fails to replicate some characteristics of this highly complex demyelinating disease. Our hypothesis is that we can develop an innovative humanized mouse model of MS that can replicate the human pathology more accurately. Such an improved model would be instrumental in achieving a better understanding of the disease and in facilitating the identification of novel therapeutic targets.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from MS patients and healthy donors were injected intraperitoneally into NOD/LtSz-scid IL-2R $\gamma$ c(null) (NSG) mice in order to achieve immune reconstitution, which was then evaluated by flow cytometry. A clinico-pathological characterization was also performed on these mice.

Results: Immune reconstitution was observed in all of our mice that received PBMC from either MS patients or healthy donors. These humanized mice however did not present any clinical manifestation of a (developing) demyelinating disease. Indeed, histological examination was consistent with this finding, showing the absence of central nervous system (CNS) demyelination. Immune cells isolated from the CNS of mice injected with MS patient PBMC did not show a distinctive immune phenotype when compared with immune cells isolated from mice that received healthy donor PBMC.

Conclusion: The intraperitoneal injection of MS patient PBMC into NSG mice induces immune reconstitution, but these mice do not develop any clinicopathological manifestation of a disease suggestive of multiple sclerosis.

**Keywords :** Multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, humanized mouse model, NSG mouse.

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des abréviations.....	11
Remerciements.....	14
Introduction.....	15
La sclérose en plaques .....	15
Aspects cliniques .....	15
Épidémiologie.....	16
Susceptibilité génétique et facteurs de risque.....	17
Immunopathologie de la SEP.....	19
Évidence de l'implication des lymphocytes T.....	20
Évidence de l'implication des lymphocytes B.....	21
Évidence de l'implication de la microglie .....	22
Les cytokines .....	23
Interleukine-17.....	23
Facteur de nécrose tumorale alpha.....	24
Interféron gamma.....	25
Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages .....	26
Mécanismes pathologiques .....	26
Histopathologie.....	28
Les modèles expérimentaux de SEP.....	28
Modèles d'EAE.....	29
EAE active .....	29
EAE passive.....	31
EAE spontanée.....	33
EAE spontanée chez la souris humanisée.....	35

Modèles de démyélinisation inflammatoire induite par un virus.....	35
Modèles de démyélinisation toxique .....	36
La souris humanisée.....	37
La souris CB17- <i>scid</i> .....	38
Les souris portant la mutation <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup> et <i>Rag2</i> <sup>-/-</sup> .....	39
La souris NOD- <i>scid</i> .....	39
La souris NOD- <i>scid</i> B2m <sup>-/-</sup> .....	40
La souris NOD- <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup> .....	41
La souris NSG.....	41
Hypothèse et objectifs.....	42
Matériels et méthodes .....	43
Patients et sujets contrôles .....	43
Isolation des cellules sanguines mononucléaires.....	44
Reconstitution immune chez la souris NSG avec cellules immunitaires humaines. ....	45
Observation clinique des animaux .....	45
Évaluation de la reconstitution immunitaire.....	46
Sacrifice et prélèvement des organes.....	48
Isolation des cellules immunitaires.....	48
Immunomarquage et cytométrie en flux sur les cellules immunitaires isolées des tissus nerveux et spléniques.....	50
Analyse des données de cytométrie en flux.....	51
Histologie cérébrale .....	52
Analyse et tests statistiques.....	53
Résultats.....	54
Reconstitution immune chez la souris NSG avec des PBMC humains de patients atteints de SEP.....	54
Caractéristiques cliniques des souris NSG avec reconstitution immune avec PBMC humains .....	57
Évaluation de la prise pondérale.....	57
Mortalité.....	58
Score clinique.....	58

L’histologie du SNC des souris NSG avec reconstitution immunitaire avec PBMC de patient SEP. .....	59
Caractérisation des cellules immunitaires humaines infiltrant le SNC des souris NSG avec reconstitution immunitaire avec PBMC humains .....	60
Immunophénotype des PBMC utilisés pour la reconstitution .....	60
Quantification de l’infiltration .....	61
Analyse qualitative de l’infiltration cellulaire au sein du SNC .....	64
Utilisation d’une technique de réduction de dimension pour étudier et comparer l’immunophénotype des cellules infiltrant le SNC dans les différents groupes de souris. .....	65
Comparaison de certains sous-types cellulaires infiltrant le SNC dans les différents groupes de souris.....	70
Les cellules immunitaires provenant de la rate ont un immunophénotype distinct de celles infiltrant le SNC.....	74
Tentative de reconstitution immunitaire chez la souris NSG avec des PBMC de patients pédiatriques avec maladie démyélinisante.....	81
Discussion.....	82
Reconstitution immunitaire par voie intrapéritonéale après irradiation sublétales .....	82
Échec de l’expression d’un phénotype clinique et immunologique s’apparentant à la SEP	83
GVHD cérébrale dans notre modèle expérimental .....	85
Expression des mécanismes pathologiques qui mènent à l’inflammation et la démyélinisation au sein du SNC .....	86
Tentative d’optimisation du modèle de souris humanisée avec maladie démyélinisante.....	89
L’utilisation de l’algorithme t-SNE pour l’analyse de données de cytométrie en flux. ....	90
Conclusion .....	92
Bibliographie.....	93

## Liste des tableaux

Tableau I.	Caractéristiques cliniques des donneurs .....	44
Tableau II.	Échelle de score EAE typique.....	46
Tableau III.	Listes des anticorps utilisés pour la cytométrie de flux .....	47
Tableau IV.	Groupes des différentes souris injectés avec les PBMC de patients avec SEP pour optimisation .....	54



# Liste des figures

Figure 1. Évaluation par cytométrie en flux de la reconstitution immune. .... 55

Figure 2. Courbe de suivi de la prise pondérale. .... 57

Figure 3. Histologie du tissu cérébral. .... 59

Figure 4. Immunophénotype des PBMC des donneurs. .... 61

Figure 5. Décompte cellulaire à l'hématimètre. .... 62

Figure 6. Décompte cellulaire avec billes de comptage par cytométrie en flux. .... 63

Figure 7. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC à j25 (MS-3 et CTRL-2). 66

Figure 8. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC à j25 (MS-4 et CTRL-3). 67

Figure 9. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC à j32 (MS-3 et CTRL-2). 68

..... 68

..... 69

Figure 10. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC à j32 (MS-4 et CTRL-3). 69

Figure 11. Phénotype des cellules immunitaires infiltrant le SNC. .... 71

Figure 12. Profil de sécrétion de IFN $\gamma$  et GM-CSF des cellules immunitaires CD4<sup>+</sup> infiltrant le SNC. .... 72

Figure 13. Profil de sécrétion de IFN $\gamma$  et GM-CSF des cellules immunitaires CD8<sup>+</sup> infiltrant le SNC. .... 73

Figure 14. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC à j25 (MS-3 et CTRL-2). .... 75

Figure 15. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC à j25 (MS-4 et CTRL-3). .... 76

Figure 16. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC à j32 (MS-3 et CTRL-2). .... 77

Figure 17. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC à j32 (MS-4 et CTRL-3). .... 78

Figure 18. Profil de sécrétion de IFN $\gamma$ et GM-CSF des cellules immunitaires isolées à partir de la rate et du SNC à j25. ....	79
Figure 19. Profil de sécrétion de IFN $\gamma$ et GM-CSF des cellules immunitaires isolées à partir de la rate et du SNC à j32. ....	80
Figure 20. Représentation schématique des stratégies pouvant être adoptées afin de développer un modèle de souris NSG humanisée de SEP. ....	84

## Liste des abréviations

ADEM : encéphalomyélite aiguë disséminée (*acute disseminated encephalomyelitis*)

BCR : récepteurs de lymphocyte B (*BCR, B cell receptor*)

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité (*major complex histocompatibility*)

DMT : traitement modifiant la maladie (*disease modifying therapy*)

FBS: sérum foetal bovin (Fetal bovine serum)

GM-CSF: facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

hCD45 : CD45 humain

IL-2 :interleukine 2

IL-17 : interleukine 17

IFN $\gamma$  : interféron gamma

LCR : liquide céphalorachidien

MBP : protéine de base de la myéline (*myelin basic protein*)

MOG : glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

NSG : NOD/LtSz-scid IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup>

PBMC : cellules mononucléées sanguines du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*)

PBS : solution tampon phosphatée saline (*phosphate-buffered saline*; PBS)

PLP : protéine protéolipidique (*proteolipid protein*)

*Prkdc*<sup>scid</sup> : *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*; SCID - severe combined immunodeficiency

SEP : sclérose en plaques

TCR : récepteur de cellules T (*T-cell receptor*)

TNF $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale alpha (tumor necrosis factor alpha)

*À mes sœurs,*

# Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'avancement de ce projet.

Merci au Dr Alexandre Prat de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir su me guider tout au long de mon projet. Son intelligence, sa vivacité et sa passion ont été pour moi de forts motivateurs. Espérons qu'il ne quitte pas le labo pour la mer des Caraïbes trop rapidement ...

Merci au Dr Patrick Cossette, qui a été d'une bonne écoute dès le début de mon projet, malgré certains obstacles qui s'imposaient alors. Il m'a aidé, à sa manière, à trouver l'équilibre qui m'a permis d'avancer. Merci aussi pour son apport scientifique.

Merci au Dr Elie Haddad, sans qui ce projet n'aurait pas eu lieu. Son esprit scientifique et son intelligence sont une source d'inspiration indéniable.

Merci aux piliers de ces laboratoires, les étudiants, mais avant tout aux chefs de laboratoire, Lyne Bourbonnière, Caroline Meloche et Kathie Beland. Je n'oublierais jamais toutes les heures de dissection, habillées comme des cosmonautes (ou presque) avec Lyne. Merci à tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyés durant ce projet; Catherine, Paula, Camille, Yousra, Laurence, Jean-Philippe, Marc, Elizabeth, Tessa, Evelyne, Stéphanie, Chloé, Antoine et Sandra.

Merci aux femmes en science en général ; et merci spécifiquement à celles qui m'inspirent grandement : Dre Catherine Larochelle, Dre Nathalie Arbour, Dre Hélène Decaluwe, Dre Elsa Rossignol et enfin Dre Ala Birca, partie beaucoup trop rapidement.

Merci aux personnes qui m'ont apporté un support précieux : Anne Bernier, Caroline Desrosiers, Claudia Morneau, Rachel Boucher, Anne Lortie, Inge Meijer et Elana Pinchefsky.

Enfin, merci à ma famille. Merci particulièrement à mes sœurs dont la force et la détermination n'ont pas d'égaux à mes yeux. J'espère pouvoir mettre autant de force et détermination dans mes projets futurs, pour changer à ma manière les choses.

# Introduction

## La sclérose en plaques

Les maladies démyélinisantes inflammatoires médiées par l'immunité sont un groupe hétérogène de maladies dont la plus commune, chez l'adulte, est la sclérose en plaques (SEP). La caractéristique pathologique de la SEP est l'accumulation de lésions démyélinisantes au niveau du système nerveux central qui, cliniquement, est associé à des déficits neurologiques réversibles ou permanents. Bien que des progrès considérables ont été faits au courant des dernières décennies pour mieux comprendre et contrôler la maladie, de nombreux aspects restent encore inconnus ce qui limite le développement de nouvelles avenues thérapeutiques.

## Aspects cliniques

La SEP est une maladie très hétérogène, tant au niveau de la présentation initiale, qu'au niveau de son évolution. Afin de mieux catégoriser les patients, 3 phénotypes principaux distincts ont été définis : la SEP de forme cyclique ou rémittente, la SEP de forme secondairement progressive et la SEP de forme primaire progressive.

Dans la forme cyclique de la SEP, le patient présente des poussées, soit des périodes de dysfonctionnement neurologique associé à de la démyélinisation, suivi de phases de rémissions avec une récupération complète ou partielle. Cette forme est la plus fréquente et représente entre 80% et 90% des présentations initiales (Dendrou, Fugger, & Friese, 2015).

La forme progressive secondaire de SEP est toujours précédée de la forme cyclique. Typiquement lorsque le patient rentre dans cette phase il y a une progression des symptômes, avec ou sans poussée et une rémission absente ou minime. Le temps moyen entre les premiers symptômes de la SEP de forme cyclique et la conversion vers une forme progressive est de 19 ans (Confavreux & Vukusic, 2006; Eriksson, Andersen, & Runmarker, 2003). Cinquante pourcent des patients atteints de la forme rémittente évolueront vers la forme progressive secondaire.

Enfin, la SEP de forme primaire progressive est caractérisée par une accumulation progressive des déficits neurologiques, avec des périodes de plateau occasionnel, sans amélioration franche. Dix pour cent des patients atteints de SEP vont correspondre à cette forme au moment du diagnostic (Thompson et al., 2018).

## **Épidémiologie**

La SEP est la première cause d'invalidité d'origine non traumatique chez le jeune adulte. Elle est donc associée à un impact socio-économique considérable (Kobelt, Thompson, Berg, Gannedahl, & Eriksson, 2017). Au Canada, en 2015, chez les personnes âgées de plus de 20 ans, l'incidence de cette maladie était de 15 personnes sur 100 000 par années et la prévalence de 270 personnes sur 100 000 (données provenant de statistique Canada). Ces taux varient de façon notable au travers le monde, et le Canada est un des pays avec les plus hauts taux de personnes vivant avec la SEP (Filippi et al., 2018).

De façon générale, la SEP a une prévalence plus élevée chez les femmes, mais cette différence liée au sexe n'a pas toujours été aussi évidente. Avant les années 50,



les études ne rapportaient pas de façon consistante une prévalence augmentée pour l'un des deux sexes (Kurland, 1952). Depuis, une claire prépondérance féminine s'est installée. Alors qu'en 1955, le ratio femme : homme estimé était de 1,4, il est passé à 2,3 en 2000 (Alonso & Hernan, 2008). Cette augmentation est liée à une augmentation de l'incidence de la maladie chez les femmes en général (Orton et al., 2006).

## **Susceptibilité génétique et facteurs de risque**

Bien que la cause exacte de la SEP soit inconnue, il est clair que l'expression de la maladie est la résultante d'une interaction entre une susceptibilité génétique et des facteurs de risque.

Les études de cohortes de jumeaux ont démontré le rôle indéniable de la susceptibilité génétique. Pour le jumeau dizygote d'un patient atteint de SEP, le risque de développer la maladie est de 3% à 5%, ce qui s'approche du risque chez une fratrie non gémellaire. Cependant pour un jumeau monozygote le risque est considérablement plus important allant de 18% à 30% selon les études (O'Gorman, Lin, Stankovich, & Broadley, 2013; Sadovnick et al., 1993). Les jumeaux partageant généralement les mêmes influences environnementales, cette différence entre les jumeaux monozygotes et dizygotes ne peut qu'être liée à des facteurs génétiques.

Par ailleurs, plusieurs polymorphismes, pour la plupart dans des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, modulent le risque de développer la SEP (Beecham et al., 2013). Parmi les plus importants, on retrouve des polymorphismes dans les gènes codant les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II. Les plus connus sont : le variant HLA-DRB1\*15 :01 (CMH de classe II)

qui est associé à une augmentation du risque de développer la maladie (Lincoln et al., 2005) et le variant HLA-A\*02 (CMH de classe I) qui est associé à une diminution du risque de développer la maladie (Brynedal et al., 2007).

Les facteurs de risque environnementaux ayant le plus haut niveau d'évidence sont : l'infection au virus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*, EBV) ; le tabagisme; l'obésité et les niveaux de vitamine D (Filippi et al., 2018).

L'infection à EBV est associée à un risque relatif de 2,3 (Thacker, Mirzaei, & Ascherio, 2006). L'association avec un risque augmenté de développer la SEP est d'autant plus importante si l'infection a eu lieu durant l'adolescence ou la période jeune adulte (Olsson, Barcellos, & Alfredsson, 2017). Pour le moment, les études n'ont réussi qu'à documenter une association, et aucun lien de causalité n'a pu être établi. Cependant, le mécanisme le plus étudié est la possibilité d'un mimétisme moléculaire menant à la génération de lymphocytes T autoréactifs (Sospedra & Martin, 2006) qui reconnaissent donc un épitope de EBV qui serait semblable à un épitope du SNC.

Le tabagisme, autant actif que passif, est aussi associé à un risque élevé de développer la SEP (Riise, Nortvedt, & Ascherio, 2003). De plus, il y a une relation de type « dose-réponse » signifiant que plus la dose cumulative de tabac est élevée plus le risque est élevé (Hedstrom, Baarnhielm, Olsson, & Alfredsson, 2009). Par ailleurs, chez les patients ayant la SEP cyclique, il a été démontré que le tabagisme est un facteur de risque de progression secondaire de la maladie (Hernan et al., 2005).

L'obésité durant l'adolescence est un facteur de risque maintenant très bien reconnu (Hedström et al., 2014). De façon intrigante, l'obésité à l'âge adulte ne semble

pas avoir autant d'impact, suggérant que l'adolescence est une période critique par rapport au risque de développer la maladie (Olsson et al., 2017).

Enfin, les niveaux sériques élevés de vitamine D sont associés à une diminution du risque de développer la SEP (Munger, Levin, Hollis, Howard, & Ascherio, 2006). Cet effet protecteur pourrait en partie expliquer la distribution géographique de la SEP; comme l'exposition au soleil stimule la production de vitamine D active, les latitudes s'éloignant de l'équateur, ayant un temps d'ensoleillement moins long, sont souvent des régions associées à une plus grande prévalence (Ghareghani, Reiter, Zibara, & Farhadi, 2018).

## **Immunopathologie de la SEP**

L'inflammation, la démyélinisation et le dommage axonal sont les trois mécanismes qui sont responsables des manifestations cliniques de la SEP (Compston & Coles, 2008). Plusieurs sous-types cellulaires sont impliqués dans les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Pendant longtemps, les études se sont concentrées sur les lymphocytes T, or, aujourd'hui, il est bien reconnu que les lymphocytes B et aussi les cellules myéloïdes incluant la microglie et les astrocytes jouent un rôle majeur dans le développement de la SEP (R. Li, Patterson, & Bar-Or, 2018). Une étude portant sur l'expression de gènes au niveau des plaques corticales a montré, qu'en plus de la présence de gènes associés à l'inflammation médiée par les lymphocytes T, les gènes associés à l'activation microgliale, au stress oxydatif et à la mort cellulaire sont aussi fortement exprimés (Fischer et al., 2013).

## Évidence de l'implication des lymphocytes T

Classiquement, la poussée est considérée comme étant associée à une activation aberrante de lymphocytes T effecteurs migrant dans le parenchyme cérébral et causant de la démyélinisation périvasculaire, de l'activation gliale et des dommages neuro-axonaux (Baecher-Allan, Kaskow, & Weiner, 2018). L'implication des lymphocytes T est supportée par des évidences tant chez l'humain que chez l'animal.

Chez l'humain, un des faits qui supporte cette hypothèse est l'augmentation du risque de développer la SEP associée à l'allèle HLA-DRB1\*15 :01 du complexe CMH II, qui est impliqué dans le développement de la tolérance centrale des lymphocytes T CD4 (Klein, Hinterberger, Wirnsberger, & Kyewski, 2009; Lincoln et al., 2005). De plus, les études pathologiques ont démontré la présence de lymphocytes T, des CD8<sup>+</sup> et en moindre proportion des CD4<sup>+</sup>, au niveau des lésions de SEP (Booss, Esiri, Tourtellotte, & Mason, 1983; B. F. G. Popescu, Pirko, & Lucchinetti, 2013). Enfin, l'efficacité de certains traitements modifiant la maladie (DMT, *disease-modifying therapies*) qui ont une action envers les lymphocytes T, supporte le rôle de ce sous-type cellulaire dans l'évolution de la pathologie. C'est le cas entre autres pour l'interféron bêta qui module l'expression de cytokines des lymphocytes T, de l'acétate de glatiramère qui accentue l'activité des lymphocytes T de type Th2 et qui favorise l'émergence lymphocyte T régulateurs et du natalizumab qui empêche la migration des lymphocytes T vers le système nerveux central (Martin, Sospedra, Rosito, & Engelhardt, 2016).

Par ailleurs, le modèle animal le plus utilisé, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE, *experimental autoimmune encephalomyelitis*), supporte cette implication des lymphocytes T. En effet, ce modèle, qui partage certaines similarités

avec la SEP, est dépendant des lymphocytes T, principalement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Zamvil & Steinman, 1990). Ceci a été démontré par le fait qu'un transfert passif de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques pour la myéline dans un animal naïf est suffisant pour déclencher la maladie (Lassmann & Bradl, 2017). De plus, l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> réduit la sévérité de l'EAE (Alters, Sakai, Steinman, & Oi, 1990; Brostoff & Mason, 1984).

### **Évidence de l'implication des lymphocytes B**

Depuis plusieurs années, les recherches ont bifurqué pour tenter d'expliquer la contribution des autres sous-types cellulaires dans le développement dans la SEP. Parmi ceux-ci, les lymphocytes B suscitent un intérêt grandissant. Plusieurs évidences chez l'humain, et, dans une moindre mesure, chez l'animal, renforcent l'importance des lymphocytes B dans la maladie. L'évidence la plus forte est l'efficacité des thérapies de déplétion de lymphocytes B, tel que l'ocreluzimab et le rituximab qui sont des anticorps monoclonaux dirigé contre le CD20 (Hauser et al., 2017; Salzer et al., 2016).

Par ailleurs, un des biomarqueurs qui peut être utilisé pour le diagnostic de SEP est la présence de bandes oligoclonales dans le liquide céphalorachidien (LCR) des patients (Thompson et al., 2018). Ces bandes oligoclonales sont des immunoglobulines de type G ou M qui sont produites par les plasmocytes intrathécaux ayant subi une expansion clonale (Owens et al., 2003). De plus, au-delà du compartiment intrathécal, cette expansion clonale est aussi observée au niveau des méninges et du parenchyme cérébral (Lovato et al., 2011).

Les mécanismes par lesquels les lymphocytes B sont impliqués ne sont cependant pas clairement élucidés, il pourrait s'agir de mécanismes qui dépendent de la production d'anticorps ou encore via des mécanismes indépendants tel que la présentation d'antigène via le CMH II (Molnarfi et al., 2013).

La contribution des lymphocytes B dans le modèle classique de l'EAE induite est plus limitée. Cependant, il existe des modèles spontanés d'EAE qui sont dépendants des lymphocytes B. C'est le cas par exemple du modèle de souris EAE spontanée TCR1640, qui exprime un récepteur de cellule T (TCR, T-cell receptor) transgénique dirigé contre le peptide 92-106 de la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*). Bien que, dans ce modèle, la maladie est dépendante de la présence de lymphocytes T autoréactifs contre une composante de la myéline, il a été démontré que la déplétion de lymphocyte B, via l'administration d'un anticorps anti-CD20, réduit de façon drastique l'apparition d'EAE chez ces souris (Pöllinger et al., 2009).

### **Évidence de l'implication de la microglie**

L'implication de la microglie est avant tout suggérée par l'abondance de microglies activées tant au niveau des lésions de SEP qu'au niveau de la substance blanche d'apparence normale (Kutzelnigg et al., 2005; Lassmann, Bruck, & Lucchinetti, 2007). Ces cellules, qui peuvent être considérées comme les macrophages résidents du système nerveux central, jouent un rôle important dans le recrutement de cellules de l'immunité adaptative entre autres en agissant comme cellules présentatrices

d'antigène (CPA) avec l'expression de CMH I et CMH II (R. M. Ransohoff & Perry, 2009).

Du côté expérimental, dans un modèle d'EAE chez une souris transgénique dont la microglie est inactivée par l'administration de ganciclovir, la souris transgénique CD11b-HSVTK, il a été démontré qu'une paralysie de la microglie résulte en une amélioration substantielle des signes cliniques et en une diminution importante de l'inflammation au niveau du SNC (Heppner et al., 2005). Cependant, il a été démontré par la suite que seul le ganciclovir est suffisant pour atténuer l'inflammation au sein du SNC lors de l'EAE (Heppner et al., 2005). De plus, une étude récente remet en doute ces observations sur la microglie en EAE. En effet, en utilisant l'EAE dans un modèle dont la déplétion de microglie est induite par une toxine diphtérique, il a été démontré qu'aucune différence n'était observable au niveau de l'inflammation, de la démyélinisation ou neurodégénérescence au niveau de la moelle épinière des souris dont la microglie a été déplétée (Rubino et al., 2018).

## **Les cytokines**

### **Interleukine-17**

Les cytokines sont des médiateurs inflammatoires importants et ont un rôle clef dans la physiopathologie de la maladie. L'implication de l'interleukine 17 (IL-17), une cytokine pro-inflammatoire, est indéniable. On retrouve d'ailleurs, au sein des lésions de SEP, une augmentation des transcrits du gène encodant pour cette cytokine (Lock et al., 2002) en plus d'un enrichissement des lymphocytes T, tant CD4<sup>+</sup> que CD8<sup>+</sup>, produisant de l'IL-17 (Kebir et al., 2009; Tzartos et al., 2008). De plus, l'expression d'IL-

17 par les cellules mononucléées est augmentée dans le LCR des patients atteints de SEP, ainsi que dans le sang au moment des poussées, lorsque comparée à des échantillons provenant de patients avec conditions neurologiques non inflammatoires (Matusevicius et al., 1999). En EAE, la neutralisation de cette cytokine est associée à une amélioration franche des symptômes (Hofstetter et al., 2005).

### **Facteur de nécrose tumorale alpha**

Chez l'humain, il a été démontré que les taux du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha) dans le LCR sont directement corrélés avec la sévérité de la maladie et à sa progression (Maimone, Gregory, Arnason, & Reder, 1991; Sharief & Hentges, 1991). D'un autre côté, les essais cliniques qui ont été faits avec des bloqueurs de TNF $\alpha$  pour le traitement de la SEP ont tous été négatifs; certains patients ayant même eu une augmentation importante de l'activité de leur maladie ("TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group," 1999; van Oosten et al., 1996). De plus, il existe une association entre les traitements d'anti-TNF $\alpha$ , traitements reconnus pour plusieurs syndromes inflammatoires, et des épisodes de démyélinisation au niveau du SNC (Kaltsonoudis, Voulgari, Konitsiotis, & Drosos, 2014; Kemanetzoglou & Andreadou, 2017).

Enfin, du côté expérimental, l'utilisation d'anticorps bloquant le TNF $\alpha$  réduit la sévérité de l'EAE (Ruddle et al., 1990). De plus les souris n'exprimant pas le TNF $\alpha$  ont cliniquement une EAE moins sévère que celles qui l'expriment (Wheeler, Zehntner,



Kelly, Bourbonniere, & Owens, 2006). Les effets opposés de la neutralisation du TNF $\alpha$  en SEP et en EAE suggère que cette cytokine a un rôle distinct dans la physiopathologie de ces deux entités.

### **Interféron gamma**

Le rôle de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) est un peu plus complexe. Initialement, on lui a attribué un rôle pathologique avec l'évidence de niveaux augmentés de cette cytokine au niveau des lésions de démyélinisations tant en EAE (Merrill et al., 1992) que chez les patients (Brosnan, Cannella, Battistini, & Raine, 1995). De plus cliniquement, l'administration d'IFN $\gamma$  a déjà été l'objet d'une étude randomisée chez les patients atteints de SEP et a été associée à des exacerbations franches de la maladie en lien avec une activation du système immunitaire (Panitch, Hirsch, Haley, & Johnson, 1987; Panitch, Hirsch, Schindler, & Johnson, 1987).

Mais cette notion a été nuancée avec l'accumulation d'évidences d'un possible rôle protecteur de l'IFN $\gamma$ . En effet, l'injection intraventriculaire de cette cytokine dans le modèle d'EAE réduit les symptômes et la mortalité (Voorthuis et al., 1990). De plus, l'administration d'IFN $\gamma$  dans un modèle d'EAE chronique est associée à un délai d'apparition des poussées (Heremans, Dillen, Groenen, Martens, & Billiau, 1996). Enfin, une étude rétrospective, faite sur des patients atteints de SEP progressive ayant été traités avec un inducteur d'IFN $\gamma$ , a démontré que les niveaux sériques de cette cytokine n'étaient pas corrélés avec la progression de la maladie. De plus, dans cette étude le patient ayant eu le niveau sérique le plus élevé est resté stable cliniquement (Bever, Panitch, Levy, McFarlin, & Johnson, 1991).

L'IFN $\gamma$  est donc une cytokine ayant probablement un rôle double, protecteur et pathogénique, et ce rôle semble être dépendant du stade de la maladie ainsi que du type cellulaire qui sécrète cette cytokine (Arellano, Ottum, Reyes, Burgos, & Naves, 2015).

### **Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages**

GM-CSF est une cytokine ayant un rôle important dans la physiopathologie de la SEP. Premièrement, il y a une augmentation de la fréquence des lymphocytes T mémoire exprimant cette cytokine chez les patients atteints de SEP; et il semble aussi y avoir une corrélation avec la sévérité de la maladie (Hartmann et al., 2014). Une autre étude a démontré que la production de GM-CSF par les lymphocytes T réactifs à la myéline est augmentée chez les patients atteints de SEP lorsque comparée à des donneurs sains (Cao et al., 2015).

Chez la souris, la démonstration la plus convaincante du rôle du GM-CSF dans l'EAE est le fait que les souris ne produisant pas de GM-CSF (souris *Csf2*<sup>-/-</sup>) sont complètement résistantes au développement de l'EAE (Croxford, Spath, & Becher, 2015; McQualter et al., 2001).

### **Mécanismes pathologiques**

Il est généralement accepté que la SEP est initiée par la présence de lymphocytes T autoréactifs au sein du SNC reconnaissant des antigènes de la myéline. Cependant, les mécanismes par lesquels ces lymphocytes T se retrouvent dans le SNC ne sont pas encore élucidés. Deux grands modèles hypothétiques sont reconnus.

Dans le premier, les lymphocytes T autoréactifs se trouvant dans des sites périphériques sont activés par des mécanismes tels que le mimétisme moléculaire (Harkiolaki et al., 2009) ou encore la co-expression de TCR avec différentes affinités (Ji, Perchellet, & Goverman, 2010). Une fois activés les lymphocytes T autoréactifs vont exprimer différentes molécules d'adhésion à leur surface qui vont faciliter leur adhésion aux parois vasculaires et leur extravasation à travers la barrière hémencéphalique (BHE) (J. M. Goverman, 2011). C'est ce qu'on appelle le modèle extrinsèque au SNC.

Dans le second modèle, c'est une atteinte du SNC qui initie l'activation des lymphocytes T autoréactifs. Cette atteinte pourrait être, par exemple, une infection virale ou encore un processus menant à une neurodégénérescence primaire. Dans ces conditions, les lymphocytes T ayant un rôle de surveillance et circulant dans le LCR (Richard M. Ransohoff & Engelhardt, 2012) pourraient être activés par des cellules immunes se trouvant dans l'espace méningé ventriculaire ou périvasculaire (McMahon, Bailey, Castenada, Waldner, & Miller, 2005). C'est ce qu'on appelle le modèle intrinsèque au SNC.

Une fois au niveau du parenchyme, ces lymphocytes T et B interagissent avec la microglie résidente du SNC et les astrocytes. C'est par contact direct ou en sécrétant des médiateurs neurotoxiques et inflammatoires, que ces cellules vont causer une atteinte des oligodendrocytes et des lésions neuroaxonales (Dendrou et al., 2015).

## **Histopathologie**

La caractéristique histopathologique de la SEP est la présence de plaques au niveau du système nerveux central, correspondant à des zones de démyélinisation (Lassmann et al., 2007). Typiquement, ces plaques se forment autour d'un vaisseau sanguin au travers duquel les cellules migrent vers le parenchyme (Kirk, Plumb, Mirakhur, & McQuaid, 2003). On retrouve de façon préférentielle ces plaques au niveau du nerf optique, en sous-pial dans la moelle épinière, au niveau du tronc cérébral et dans la substance blanche périventriculaire (B. F. Popescu & Lucchinetti, 2012). Ces lésions peuvent être classées selon la présence et la localisation des macrophages et des microglies activées au travers de la lésion (Kuhlmann et al., 2017). Ainsi, une lésion est dite active lorsque les macrophages et les microglies activées sont répartis dans l'ensemble de la lésion et qu'ils ont phagocyté de la myéline. Une lésion active/inactive va présenter un centre acellulaire encerclé par des macrophages et des microglies. Enfin, une lésion inactive est dépourvue de macrophages et de microglies.

## **Les modèles expérimentaux de SEP**

Plusieurs modèles expérimentaux sont utilisés pour étudier la SEP. On peut généralement les classer en trois grandes catégories : les modèles d'EAE, les modèles de démyélinisation inflammatoire induits par un virus et les modèles de démyélinisation toxique (Lassmann & Bradl, 2017). Tous ces modèles ont certaines limitations, il est donc important de choisir celui qui est le plus approprié selon la question de recherche.

## **Modèles d'EAE**

Au début 20e siècle, la vaccination antirabique a été associée à des complications neurologiques majeures (Stuart & Krikorian, 1928) dont l'étude pathologique suggérait de grandes similarités avec la SEP, incluant des foyers de démyélinisation (Shiraki & Uchimura, 1957). La préparation des vaccins antirabique à cette époque se faisait à partir d'homogénat de tissu cérébral de chèvres ou de moutons infectés qui, ensuite, étaient inactivés chimiquement. C'est donc le contenu élevé en myéline qui causait la sensibilisation à l'origine de l'atteinte neurologique inflammatoire démyélinisante importante que présentaient certains patients (Hicks, Fooks, & Johnson, 2012).

C'est en se basant sur les complications liées au contenu en myéline des vaccins antirabiques que les modèles EAE ont été développés. Ils ont tous en commun la présence de neuro-inflammation au niveau du SNC suite à une activation du système immunitaire.

### **EAE active**

Dans le modèle d'EAE active, l'animal est directement immunisé contre la myéline. Pour ce faire, une émulsion de peptide de myéline avec un adjuvant, appelé adjuvant de Freund, est injectée à l'animal par voies sous-cutanées. L'adjuvant de Freund est nécessaire pour obtenir une immunisation efficace avec une seule injection de peptide de myéline (Stromnes & Goverman, 2006a). Les mécanismes par lesquels l'adjuvant de Freund agit sont multiples. Il est généralement accepté que ce type d'émulsion prolonge la demi-vie de l'antigène au site d'injection (Herbert, 1968). De

plus, l'adjuvant de Freund contient du *Mycobacterium tuberculosis*. Ceci favorise la capture d'antigènes par les CPA et en favorise la présentation ce qui résulte en une activation et une expansion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Billiau & Matthys, 2001).

Chez la souris, tout dépendant de sa susceptibilité génétique à l'EAE, il peut être nécessaire d'administrer en plus une toxine pertussique afin que la maladie se développe (Linthicum & Frelinger, 1982). Les mécanismes par lesquels cette toxine contribue au développement de la pathologie ne sont cependant pas complètement élucidés. Il est possible que cette toxine contribue à l'altération de la BHE et à sa perméabilisation, facilitant l'entrée des cellules immunitaires au niveau du système nerveux central (Lu et al., 2008; Munoz, Bernard, & Mackay, 1984). Elle aurait aussi un rôle dans l'inhibition de l'anergie des lymphocytes T autoréactifs circulants (Kamradt, Soloway, Perkins, & Gefter, 1991), dans la perte de tolérance périphérique des lymphocytes T (Hanspeter Waldner, Collins, & Kuchroo, 2004), et dans la suppression des lymphocytes T régulateurs (Chen et al., 2006).

Le type de progression d'EAE, soit la forme avec rémission ou la forme progressive, dépend de la combinaison entre la souche de la souris et l'antigène utilisé (Miller & Karpus, 2007; Stromnes & Goverman, 2006a). Les trois antigènes utilisés sont des protéines de la myéline utilisées entièrement ou en fragments. Ces protéines sont le MOG, la protéine protéolipidique (PLP, *proteolipid protein*) et la protéine de base de la myéline (MBP, *myelin basic protein*)(Stromnes & Goverman, 2006a).

Dans ce type de modèle, la souris va présenter une paralysie caudo-rostrale. Les premiers symptômes apparaissent habituellement entre 9 et 20 jours après l'immunisation (Stromnes & Goverman, 2006a).

Une des limitations importantes de ce modèle est le fait qu'il soit causé par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> autoréactifs limités au CMH II. Bien que ce modèle partage certaines caractéristiques avec la SEP, ce mécanisme physiopathologique initiant l'EAE ne fait pas nécessairement partie des mécanismes responsables de la SEP (Lassmann & Bradl, 2017). De plus, du fait que ce modèle est basé sur une immunisation contre des antigènes de la myéline via une injection en périphérie, il est impossible d'étudier l'hypothèse du modèle mécanistique dite intrinsèque au SNC où il est présumé que l'activation des lymphocytes T autoréactifs se fait au sein du système nerveux central (Kipp, Nyamoya, Hochstrasser, & Amor, 2017).

Par ailleurs, le fait que la pathologie soit confinée au niveau de la moelle épinière et, rarement, avec une atteinte limitée dans le tronc et le cervelet est une autre limitation de ce modèle puisque dans la SEP la maladie peut toucher l'ensemble du SNC (Behan & Chaudhuri, 2014).

### **EAE passive**

Le principe de l'EAE passive est d'effectuer un transfert adoptif de cellules immunitaires activées chez une souris receveuse naïve. Pour ce faire, les animaux donneurs sont tout d'abord immunisés avec des composantes de la myéline de la même façon que dans l'EAE active. Environ une dizaine de jours suivant l'immunisation, ces animaux sont sacrifiés et les leucocytes des organes lymphoïdes

secondaires sont isolés et activés in vitro dans des conditions favorisant la prolifération des lymphocytes T spécifique pour la myéline; ce sont ensuite ces cellules qui sont injectées par voie intraveineuse ou intrapéritonéale dans les souris receveuses. De la toxine pertussique peut être administrée dans les jours suivant le transfert, pour les mêmes raisons que dans l'EAE active (Stromnes & Goverman, 2006b; Wekerle, Kojima, Lannes-Vieira, Lassmann, & Linington, 1994).

Dans ce modèle, comme l'animal receveur n'est pas soumis à une immunisation, l'inflammation au niveau du SNC peut être étudiée sans craindre une contribution de cette immunisation via des mécanismes qui lui sont propres (Lassmann & Bradl, 2017). L'avantage le plus grand de ce modèle est de pouvoir manipuler les cellules avant leur injection. Ainsi, certaines sous-populations peuvent être enrichies, déplétées ou marquées avant l'injection pour mieux comprendre les mécanismes pathologiques. De cette façon, il devient aussi plus facile d'étudier les mécanismes responsables de l'infiltration des cellules immunitaires pathogéniques dans le SNC (Bartholomäus et al., 2009; Flugel et al., 2001; Kawakami et al., 2005; Reboldi et al., 2009; Renno, Krakowski, Piccirillo, Lin, & Owens, 1995).

Tout comme dans l'EAE induite classique, ce modèle est complètement dépendant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> autoréactifs limités au CMH II, ce qui induit un biais important. Cependant, afin de contourner ce désavantage une équipe a développé un modèle d'EAE passive avec un transfert de lymphocyte T CD8<sup>+</sup> limité au CMH I créant donc une inflammation du SNC dépendante de ce sous-type cellulaire (Huseby et al., 2001). Dans certaines conditions, ce modèle est associé à des lésions pathologiques partageant certaines caractéristiques de la SEP telles que



des plaques de démyélinisation (Saxena et al., 2008). Il n'existe pas pour le moment de modèle d'EAE passive qui soit dépendant des lymphocytes B.

### **EAE spontanée.**

Comme les modèles d'EAE passive et active sont basés sur le principe d'une immunisation initiale contre les antigènes de la myéline, ce type de modèle expérimental n'est pas idéal pour étudier les mécanismes initiaux de la SEP comme ceux qui déclenchent l'activation des lymphocytes T autoréactifs. Afin de contourner cette limitation, de nombreux modèles d'EAE spontanée ont été développés (Ben-Nun et al., 2014). Des manipulations génétiques permettent de générer des souris dont les lymphocytes T expriment un TCR qui reconnaît un antigène du SNC. Les modèles qui ont été développés jusqu'à présent ont pour cible soit le MBP (J. Goverman et al., 1993; Lafaille, Nagashima, Katsuki, & Tonegawa, 1994), soit le PLP (H. Waldner, Whitters, Sobel, Collins, & Kuchroo, 2000), soit le MOG (Anderson et al., 2012; Bettelli et al., 2003; Pöllinger et al., 2009) ou encore la protéine acide fibrillaire gliale (*GFAP, Glial fibrillary acidic protein*) (Sasaki et al., 2014). Chacune de ces souris ont des propensions différentes à développer l'EAE et cette propension est parfois dépendante du sexe (Pöllinger et al., 2009). Les sites anatomiques touchés par l'inflammation et la démyélinisation sont eux différents entre ces modèles (Lassmann & Bradl, 2017).

Les modèles d'EAE spontanées sont un outil précieux pour étudier l'influence de certains facteurs sur la maladie. Par exemple, les interactions entre la flore microbienne et l'inflammation du SNC (Berer et al., 2011).

L'avantage avec ces souris c'est aussi qu'elles peuvent par la suite être croisées pour élaborer des modèles plus complexes. Ainsi des modèles de démyélinisation ont été générés chez des souris exprimant un TCR transgénique spécifique au MOG et une immunoglobuline G elles aussi spécifiques au MOG. Ceci permet donc d'étudier entre autres les mécanismes liés à l'interaction entre les lymphocytes B et les lymphocytes T dans la pathologie (Bettelli, Baeten, Jager, Sobel, & Kuchroo, 2006; Krishnamoorthy, Lassmann, Wekerle, & Holz, 2006).

Enfin, un autre avantage de ces modèles est qu'il est possible d'utiliser les leucocytes des souris transgéniques d'EAE spontanée et d'en faire un transfert adoptif dans des souris naïves afin de mieux pouvoir étudier certaines caractéristiques du modèle transgénique initiales en départageant ce qui appartient aux cellules immunitaires de ce qui appartient reste de l'organisme. C'est avec cette stratégie qu'il a récemment été démontré que, pour le modèle d'EAE spontanée TCR1640 dont l'expression de la maladie est dépendante du sexe (Pöllinger et al., 2009), le phénotype de la maladie est plus précisément dépendant du sexe des leucocytes et non du sexe du receveur (Dhaeze et al., 2019).

Comme les modèles d'EAE active et passive, les modèles d'EAE spontanée, sont, pour la plupart, associés à une inflammation du SNC qui est médiée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ce qui ne reflète pas nécessairement les mécanismes physiopathologiques de la SEP.

## **EAE spontanée chez la souris humanisée**

D'un point de vue génomique, l'humain a une homologie avec la souris de plus de 90 % et d'un point de vue moléculaire les protéines de la myéline sont hautement conservées (Chinwalla et al., 2002). Ceci fait de la souris un modèle intéressant à utiliser en neurosciences. Cependant, les différences liées au système immunitaire sont beaucoup plus importantes. C'est le cas par exemple pour la présentation d'antigène via les CMH. En effet, ces molécules, en plus d'être extrêmement polymorphiques, présentent d'importantes différences entre les espèces (Shiina, Blancher, Inoko, & Kulski, 2017). Ainsi, pour pouvoir réellement étudier les mécanismes liés au potentiel encéphalitogénique des lymphocytes T autoréactifs, quelques modèles de souris EAE spontanée humanisées ont été élaborés via l'expression transgénique de CMH I ou de CMH II humain (Ellmerich et al., 2004; Friese et al., 2008; Madsen et al., 1999).

## **Modèles de démyélinisation inflammatoire induite par un virus**

La démyélinisation d'origine inflammatoire induite par un virus est un phénomène bien connu tant chez l'humain que chez la souris et est associée à des virus bien précis (Haley & Atwood, 2017; Mecha, Carrillo-Salinas, Mestre, Feliu, & Guaza, 2013; Shishido-Hara, 2015). C'est sur cette base que des modèles expérimentaux d'infection virale ont été développés pour étudier les mécanismes d'inflammation, de démyélinisation et de neurodégénérescence (Clatch, Lipton, & Miller, 1986; Gerhauser, Hansmann, Ciurkiewicz, Loscher, & Beineke, 2019; Kenyon et al., 2015).

Bien que ces modèles puissent être un outil précieux pour étudier certains mécanismes pathologiques qui pourraient être partagés avec la SEP, ils comportent des limitations importantes. La principale étant le fait que l'infection, en tant que telle, est associée à des mécanismes antiviraux et auto-immuns qui ne sont pas nécessairement liés à l'inflammation, à la démyélinisation ou à la neurodégénérescence (Procaccini, De Rosa, Pucino, Formisano, & Matarese, 2015).

### **Modèles de démyélinisation toxique**

Les modèles de démyélinisation toxique sont indépendants de processus immunitaires induits, ce qui en fait des modèles intéressants pour étudier les mécanismes de la démyélinisation et de la remyélinisation dans des conditions uniformisées (Franklin & Gallo, 2014).

Il existe principalement trois grands modèles de démyélinisation toxique : la démyélinisation induite par le cuprizone, la démyélinisation induite par la lysolécithine et la démyélinisation induite par l'éthidium bromide (Lassmann & Bradl, 2017).

Le cuprizone est un chélateur du cuivre qui est ajouté à la diète des souris. Ce traitement cause une apoptose des oligodendrocytes et induit la démyélinisation via des mécanismes de stress oxydatifs (Blakemore, 1972; Kesterson & Carlton, 1972; Pattison & Jebbett, 1971; Praet, Guglielmetti, Berneman, Van der Linden, & Ponsaerts, 2014). Lorsqu'on retire le cuprizone de la diète de ces souris, des processus de remyélinisation prennent place, impliquant la microglie et les astrocytes (Gudi, Gingele, Skripuletz, & Stangel, 2014).

La lysolécithine est administrée localement par injection au niveau de la substance blanche. Elle agit comme détergent et induit des dommages à la membrane lipidique des feuillettes de myéline causant ainsi une démyélinisation primaire. Dans les jours suivant l'injection un processus de remyélinisation spontanée est observé (Hall, 1972; Jeffery & Blakemore, 1995; Pavelko, van Engelen, & Rodriguez, 1998).

Enfin, l'éthidium bromide s'administre de la même façon que la lysolécithine soit localement au niveau de la substance blanche. Cet agent a non seulement un effet toxique sur les oligodendrocytes, mais aussi sur les astrocytes créant leurs déplétions au site d'injection (Blakemore & Franklin, 2008; Kuypers, James, Enzmann, Magnuson, & Whittemore, 2013; Woodruff & Franklin, 1999).

L'étude de la démyélinisation et de la remyélinisation est un point crucial pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Actuellement, aucun traitement ne cible de façon primaire la remyélinisation, alors que cette stratégie a un potentiel indéniable (Lutterotti, 2018; Plemel, Liu, & Yong, 2017).

## **La souris humanisée**

Le terme souris humanisée peut faire référence aux souris issues de manipulations génétiques leur permettant d'exprimer des gènes humains (Gregersen, Holmes, & Fugger, 2004), par exemple l'expression d'un CMH humain tel que décrit plus haut. Dans cette section nous allons nous concentrer sur celles ayant une immunodéficience permettant la greffe de cellules humaines.

L'utilisation de la souris humanisée en recherche est de plus en plus populaire depuis le début des années 2000. Ce type de modèle permet de faire de la recherche

dans un modèle murin tout en contournant le problème des différences existant entre l'humain et la souris (Zschaler, Schlorke, & Arnhold). En plus, ce modèle est un tremplin important pour la médecine personnalisée (Leonard D. Shultz, Brehm, Garcia-Martinez, & Greiner, 2012; Walsh et al.).

Il existe maintenant un grand nombre de modèles de souris humanisées, ayant toutes des caractéristiques qui leurs sont propres. Tout comme les différents modèles d'EAE, il est important de choisir le modèle qui permettra de générer des résultats qui soit juste en fonction de la question de recherche. Dans cette section-ci, seulement quelques modèles ont été décrits, les plus pertinents par rapport au sujet de recherche (Leonard D. Shultz et al., 2012; L. D. Shultz, Ishikawa, & Greiner, 2007).

### **La souris CB17-scid**

C'est dans les années 80 qu'un des premiers modèles de souris humanisée, la souris CB17-scid a été décrite (G. C. Bosma, Custer, & Bosma, 1983). Cette souris est porteuse d'une mutation  $Prkdc^{scid}$  (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide; SCID - severe combined immunodeficiency), qui résulte en une incapacité de recombinaison des segments V(D)J pour la formation des TCR et des récepteurs de lymphocyte B (*BCR, B cell receptor*) (M. J. Bosma & Carroll, 1991; Lieber et al., 1988; Malynn et al., 1988) associé à une absence de lymphocyte T et de lymphocyte B matures. Ceci rend possible la greffe de PBMC humains (Mosier, Gulizia, Baird, & Wilson, 1988), de tissus hématopoïétiques foetaux (McCune et al., 1988) et de cellules souches hématopoïétiques humaines (Lapidot et al., 1992). Cependant, le système immunitaire humain ainsi greffé est non fonctionnel à cause d'une certaine immunité

de l'hôte persistante chez ces souris (Mosier et al., 1988). En effet, l'immunité innée de ces souris n'est pas directement affectée par la mutation *Prkdc<sup>scid</sup>*. De plus, elles ont des hauts taux de cellules NK et génèrent de façon spontanée des lymphocytes T et des lymphocytes B avec l'âge (D. L. Greiner, R. A. Hesselton, & L. D. Shultz, 1998). Enfin, la mutation, qui implique une kinase ayant un rôle dans la réparation de l'ADN, rend ces souris sensibles à la radiation (Fulop & Phillips, 1990) en plus de réduire considérablement l'espérance de vie de la souris. Ceci est une limitation importante considérant que l'irradiation myéloablatrice pré-greffe est associée à de plus hauts taux de prise de greffe (McIntosh & Brown, 2015; L. D. Shultz et al., 2005),

### **Les souris portant la mutation *Rag1<sup>-/-</sup>* et *Rag2<sup>-/-</sup>***

Au début des années 90, les souris porteuses de la mutation *Rag1* (*recombination-activating gene 1*) (Mombaerts et al., 1992) et *Rag2* (*recombination-activating gene 2*) (Shinkai et al., 1992) ont été développées. Ces mutations interfèrent encore une fois avec la recombinaison des segments V(D)J ce qui empêche la formation des TCR et des immunoglobulines (Mombaerts, 1995). Comme c'est le cas pour les CB17-*scid*, ces souris ont des hauts taux de cellules NK, génèrent de façon spontanée des lymphocytes T et de lymphocytes B avec l'âge et conservent leur immunité innée. Cependant, elles n'ont pas de sensibilité à la radiation (Leonard D. Shultz et al., 2012).

### **La souris NOD-*scid***

La souris NOD-*scid* est issue du croisement entre la souris NOD (*non-obese diabetic*) et une souris, décrite ci-haut, portant une mutation *Prkdc<sup>scid</sup>* (L. D. Shultz et

al., 1995). L'avantage d'utiliser la souris NOD dans ce croisement est que ce type de souris a une immunité innée déficiente. Plus précisément, on observe chez les souris NOD une absence du complément circulant (Baxter & Cooke, 1993), une diminution de l'activité des cellules NK (Kataoka et al., 1983; L. D. Shultz et al., 1995) et une perte de fonction et de différenciation des CPA (Pearson et al., 2003; Serreze, Gaedeke, & Leiter, 1993).

Ces souris immunodéficientes peuvent être greffées avec des PBMC humains et des cellules souches hématopoïétiques; elles ont des meilleurs taux de prise de greffe que les souris ayant la mutation *Prkdc<sup>scid</sup>*, *Rag1* et *Rag2* (Hesselton et al., 1995; Lowry et al., 1996; Pflumio et al., 1996). Cependant, elles sont sensibles à la radiation, à cause de leur mutation *Prkdc<sup>scid</sup>*, et ont une activité résiduelle de l'immunité innée incluant les cellules NK.

### **La souris NOD-*scid* B2m<sup>-/-</sup>**

Il a été démontré que l'activité des cellules NK chez les souris *SCID* interférait avec la prise de greffe des cellules hématopoïétiques humaines (Christianson et al., 1996). Afin d'améliorer le taux de prise de greffe, des souris NOD-*scid* ont été croisées avec des souris portant une mutation dans le gène de la beta2-microglobuline qui est associée à une perte d'activité des cellules NK. Comme attendu, ces souris ont des très bons taux de prise de greffe à partir de PBMC humain ou de cellules souches hématopoïétiques (Christianson et al., 1997; Lapidot, 2001).

Les souris avec mutation dans le gène de la beta2-microglobuline n'exprimeront pas de CMH I. De plus, cette mutation va interférer avec le métabolisme du fer causant



une hémochromatose chez toutes les souris qui en sont porteuses (Christianson et al., 1997).

### **La souris NOD-*Rag1*<sup>-/-</sup>**

Chez les souris NOD-*Rag1*<sup>-/-</sup>, la mutation *Rag1*<sup>-/-</sup> va résulter en l'absence de lymphocytes T et B matures tandis que la génétique NOD va être associée à une immunité innée dont la fonction est atténuée. Ces souris ont l'avantage de ne pas être sensibles à la radiation, mais les taux de réussite de greffe sont très variables en raison de l'activité résiduelle des cellules NK (L. D. Shultz et al., 2000).

### **La souris NSG**

La souris NSG est une souris qui partage les caractéristiques des souris NOD-*scid* en plus d'avoir une mutation homozygote dans le gène codant pour la chaîne gamma du récepteur de l'interleukine 2. L'intégrité de ce gène et de son expression est cruciale pour l'expression et les mécanismes de signalisation du récepteur de l'IL-2; mais aussi pour ceux de l'interleukine 4, l'interleukine 7, l'interleukine 9, l'interleukine 15 et l'interleukine 21 (Ishikawa et al., 2005; M. Ito et al., 2002; L. D. Shultz et al., 2005; Traggiai et al., 2004). À cause de l'atteinte des voies de signalisation multiples, via l'absence de la chaîne gamma du récepteur de l'interleukine 2, ces souris ont une atteinte sévère du développement et de la fonction des lymphocytes T et B et ont une absence complète des cellules NK. De plus, elles ont une quasi-absence du système immunitaire inné. Ces souris ont donc une déficience immunitaire profonde ce qui facilite la prise de greffe de tissus humains, de cellules souches hématopoïétiques et de PBMC.

## Hypothèse et objectifs

Le modèle de souris humanisée de l'encéphalite de Rasmussen, issue d'une collaboration incluant le laboratoire du Dr Prat, a pu démontrer que la souris NSG humanisée est un outil précieux pour l'étude des maladies impliquant le système immunitaire (Kebir et al., 2018). L'hypothèse de ce projet est qu'un modèle de souris humanisée de SEP peut être développé chez la souris NSG.

Afin de valider notre hypothèse, les objectifs suivants ont été établis :

1. Procéder à la reconstitution immune chez la souris la souris NSG à partir de PBMC provenant de patient atteint de SEP.
2. Caractériser cliniquement, en utilisant les courbes de poids et les scores cliniques, les symptômes suggérant une atteinte démyélinisante chez la souris NSG avec reconstitution immune à partir de PBMC de patients atteints de SEP.
3. Caractériser histologiquement la présence de démyélinisation.
4. Caractériser quantitativement l'infiltrat de cellules immunitaires au sein du parenchyme cérébral.
5. Caractériser qualitativement l'infiltrat de cellules immunitaires au sein du parenchyme cérébral.

## Matériels et méthodes

### Patients et sujets contrôles

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) des patients proviennent de la biobanque de patients SEP du CRCHUM (N. Arbour; C. Larochelle; A. Prat) et de la biobanque des patients avec maladie neuroimmunologique du centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine (E. Haddad). Les caractéristiques cliniques des patients et des sujets sains sont résumées dans le tableau 1. Un consentement écrit a été obtenu de la part des sujets sains, des patients ou des parents des patients (dans le cas des patients pédiatriques). Tous les patients atteints de SEP étaient en poussée clinique au moment du prélèvement et ne prenaient aucun traitement modifiant la maladie (*disease modifying therapy*; DMT). Aucun patient n'avait pas reçu de corticothérapie dans les 3 semaines précédant le prélèvement. Le patient avec l'encéphalomyélite aigue déssiminée (ADEM, *acute dessiminated encephalomyelitis*) ne prenait pas de médicament sur base chronique.

Tableau I. Caractéristiques cliniques des donneurs

Code de l'échantillon de PBMC	Sexe	Âge (ans)	Diagnostic médical	Âge au diagnostic (ans)
MS-1	Homme	69	Sclérose en plaques cyclique	63
MS-2	Femme	29	Sclérose en plaques cyclique	17
MS-3	Femme	34	Sclérose en plaques cyclique	25
MS-4	Femme	25	Sclérose en plaques cyclique	20
MSped-1	Homme	15	Sclérose en plaques cyclique	15
ADEMPed	Homme	7	ADEM	7
CTRL-2	Femme	-	aucun	-
CTRL-3	Femme	-	aucun	-
CTRL-4	Homme	-	aucun	-
CTRL-5	Homme	-	aucun	-

## Isolation des cellules sanguines mononucléaires

À partir du sang périphérique des donneurs, les PBMC ont été isolés par gradient de densité en utilisant du Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare). Des aliquots de 1 ml contenant entre 10 et 20 millions de cellules ont ensuite été cryopréservés dans un mélange de RPMI1640 + 10% de sérum bovin foetal (*Fetal bovine serum*; FBS) et de milieu de congélation dans un ration de 1 :1. Pour ce faire, les cellules ont tout d'abord été resuspendues dans le RPMI1640 avec 10% FBS et le milieu de congélation (diméthylsulfoxyde 20%, FBS 80%) y a été incorporé lentement au goutte-à-goutte. Les aliquots ont ensuite été conservés au congélateur à – 80°C entre 24h et 72h dans une boîte de congélation contenant de l'isopropanol, puis ont été transférés dans les réservoirs d'azote liquide.

## **Reconstitution immune chez la souris NSG avec cellules immunitaires humaines.**

Les souris NSG, provenant du laboratoire du Dr Haddad, âgées de 6 à 9 semaines, ont préalablement été irradiées dans les 24 heures précédant l'injection de PBMC. L'irradiation de 2 Gy a été faite avec un irradiateur radiobiologique (Faxitron, modèle CP-160). Les PBMC décongelés resuspendus dans une solution tampon phosphatée saline (*phosphate-buffered saline*; PBS) ont été injectés chez la souris NSG par voie intrapéritonéale ou intraveineuse via la veine caudale. Variant selon l'expérience et la disponibilité des cellules, entre quatre à six souris ont été injectées avec le même donneur. Selon l'expérience, un, deux ou six millions de cellules ont été injectées. Pour les 10 premiers jours suivant l'irradiation de l'enrofloxacin est ajoutée à l'eau comme antibiothérapie prophylactique.

### **Observation clinique des animaux**

Suivant les injections de PBMC, les souris étaient suivies quotidiennement avec une évaluation de la prise de poids et du score clinique EAE typique. Le tableau 2 décrit l'échelle utilisée pour ce score. Toute autre observation clinique pertinente était aussi notée.

Les souris étaient également suivies aussi pour des signes de GVHD se manifestant par la perte rapide de poids, une fourrure ébouriffée, une posture voutée ou une inactivité (Cooke et al., 1996). Si la souris présentait une perte de poids importante (plus de 20% du poids pré-transfert de PBMC) qui était associée à des

signes cliniques de GVHD elle était sacrifiée. Les données provenant des souris dont la GVHD était trop importante ont été exclues.

Tableau II.Échelle de score EAE typique

Score clinique typique	Symptômes
0	Aucun symptôme
0,5	½ queue flasque
1	Paralyse complète de la queue
1,5	1 + démarche altérée
2	Légère faiblesse des membres postérieurs et altération du réflexe de redressement
2,5	2 + démarche « en canard »
3	Parésie prononcée d'un membre postérieur engendrant une boiterie ou paralysie d'un membre postérieur
3,5	Parésie prononcée de deux membres postérieurs
4	Paralyse des deux membres postérieurs
4,5	Paralyse des deux membres postérieurs et faiblesse des membres antérieurs
5	État moribond

## Évaluation de la reconstitution immunitaire

L'évaluation de la reconstitution immunitaire a été faite par cytométrie de flux sur sang périphérique de façon hebdomadaire à partir de la deuxième semaine suivant l'injection. Plus précisément, après une perforation de la veine saphène à l'aide d'une aiguille de 25G, entre 100 et 150 µl de sang périphérique était récupéré par capillarité dans un tube avec lithium héparine (microvette®200). Dans un tube de 10 ml destiné à la cytométrie de flux, 100µl de sang périphérique était incubé pendant 8 minutes avec 2 ml de solution BD™ Pharm Lyse (BD Biosciences). Les échantillons ont ensuite été lavés deux fois avec du PBS. La centrifugation entre les lavages était de 400g pendant 5 minutes. Ensuite, les anticorps de surface, ainsi que leurs isotypes sont incubés

pendant 30 minutes. La liste des anticorps utilisés est résumée dans le tableau III. Après un lavage, les cellules sont resuspendues dans une solution tampon de FACS (PBS contenant 1 % de FBS et 0,1 % d'azoture de sodium) et 10µl de billes de comptage CountBright™ (Invitrogen) y sont ajoutés. Des billes de compensation OneComp eBeads™ (Invitrogen) ont été préparées en parallèle pour tout fluorochrome. L'acquisition des données a été faite sur un cytomètre en flux (LSR II, BD biosciences) à l'aide du logiciel BD FACSDiva (BD biosciences).

La dernière évaluation de la reconstitution immunitaire a été effectuée dans les 24 heures précédant le sacrifice des souris et le prélèvement des organes.

Tableau III. Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie de flux

Antigène	Fluorochrome	Compagnie	Référence	Panel sang périphérique	Panel cellules immunitaires infiltrant les tissus
mCD45	PerCP-Cy5.5	BD	550994	X	X
hCD45	FITC	BD	555482	X	X
hCD3	BV605	Biolegend	317322	X	X
hCD4	PE-Cy7	BD	557852	X	X
hCD8	APC-Cy7	BD	557834	X	X
hCD19	PE	BD	561741	X	
hCD11c	APC	BD	560895	X	X
HLA-DR	V450	BD	561359	X	X
hTCRgd	PE-CF594	BD	562511	X	X
hIFNγ	AF700	BD	557995		X
hGM-CSF	PE	BD	554507		X
hIL-17a	BV786	BD	563745		X

## **Sacrifice et prélèvement des organes**

Pour le prélèvement d'organes, les souris ont tout d'abord été anesthésiées avec une dose létal de pentobabital de sodium (Euthanyl™) par voies intrapéritonéale. Ensuite, une incision thoracoabdominale par une approche ventrale a été pratiquée pour faciliter un l'accès aux organes. Une perfusion cardiaque intraventriculaire gauche avec 25 ml de PBS froid a été effectuée. Après la perfusion, le cerveau, la moelle épinière et la rate ont été disséqués. Le cerveau a été sectionné au niveau de ligne médiane, une moitié étant destinée à l'isolation des cellules pour la cytométrie de flux, l'autre étant destinée aux études histologiques. La moelle épinière a été sectionnée en huit segments égaux sur l'axe rostrocaudale et, encore une fois, une moitié (4 segments) était destinée à la cytométrie de flux et l'autre à l'histologie. Les échantillons destinés à la cytométrie de flux ont été recueillis dans du milieu RPMI 1640™ avec pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 µg/ml; et ont été analysés immédiatement après leur isolation. Les échantillons destinés à l'histologie ont été placés dans un moule recouvert d'OCT™ (*Optimal Cuting Temperature*, TissueTek) puis conservés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

## **Isolation des cellules immunitaires**

### **Tissu cérébral et médullaire**

À l'aide de ciseaux chirurgicaux, le tissu cérébral et médullaire a été réduit en très petits morceaux. Par la suite, les échantillons ont été traités à la collagénase D (Roche diagnostic) à une concentration de 2mg/ml et ADNase1 (Roche diagnostic) à une concentration de 14ng/ml pendant 15 minutes à 37°C. Les échantillons ont ensuite



rapidement été placés sur la glace et du RPMI1640™ a été ajouté afin d'arrêter la réaction enzymatique. Le tout a alors été filtré au travers d'un filtre de 70µm à l'aide d'un piston. La suspension cellulaire a été lavée par l'ajout de RPMI 1640™ avec pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml et FBS 10% et centrifugée à 1500 RPM pendant 10 minutes. Une séparation par gradient de Percoll™ a permis ensuite de mieux séparer les cellules immunitaires des débris, de la myéline et des globules rouges restant. Le culot cellulaire a été resuspendu dans une solution de Percoll™ à 90 %, puis des couches de Percoll™ 60%, 40% et 0% (dans la solution saline équilibrée de Hank; *Hank's Balanced Salt Solution*- HBSS) ont été ajoutées. Après une centrifugation de 1500 RPM de 10 minutes les cellules immunitaires à l'interface 40%-60% ont été récupérées et rapidement lavées avec du HBSS puis centrifugées à nouveau. Un dernier lavage a été effectué avec du milieu RPMI 1640™ avec pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml et FBS 10%. Après une centrifugation de 10 minutes à 1500 RPM les cellules ont été resuspendues dans 200 µl de milieu RPMI 1640™ avec pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml et FBS 10%. Un décompte cellulaire a été fait à l'hématimètre. Pour ce faire, une dilution 1/2 dans du bleu de trypan 0,1X est effectué et 10µL de la suspension est déposé dans l'hématimètre pour faire le décompte cellulaire.

### **Rates**

Les rates sont écrasées à l'aide d'un piston au travers d'un filtre de 70µm. Cette suspension a ensuite été centrifugée à 1200 RPM pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans du chlorure d'ammonium 0,83% pendant 4 minutes, puis est inactivé par l'ajout de RPMI 1640™ avec pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 µg/ml. Les

échantillons ont été centrifugés à 1200 RPM pendant 10 minutes. Le culot a ensuite été resuspendu dans du RPMI 1640™ avec pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 µg/ml et refiltré au travers d'un filtre de 70µm. Après une centrifugation de 1200 RPM de 10 minutes, les cellules ont été resuspendues dans du RPMI 1640™ avec pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml et FBS 10%. Le décompte cellulaire à l'hématimètre a été fait en utilisant 10 µl après une dilution de 1/10 dans du bleu de trypan 0,1X.

## **Immunomarquage et cytométrie en flux sur les cellules immunitaires isolées des tissus nerveux et spléniques**

Dans le but de faire un marquage intracellulaire, les cellules ont été stimulées à 37°C pendant 4 heures dans une solution de RPMI 1640™ avec pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml et FBS 10% à laquelle on ajoute de l'ionomycine à 1 µg/ml, (Sigma-Aldrich), du phorbol 12-myristate 13-acetate à 20 ng/ml (Sigma-Aldrich) et de la brefeldin A à 2 µg/ml (BD GolgiPlug™). Les cellules ont ensuite été centrifugées et lavées avec du PBS. Une incubation de 15 minutes a suivi avec une solution de blocage avec de l'anti-CD16/CD32 (1:50, BD Biosciences). Les cellules ont été lavées avec du PBS et incubées dans une seconde solution de blocage des fragments Fc humain (BD Biosciences). Les cellules ont été à nouveau lavées puis ont été incubées 30 minutes à 4°C avec le mélange d'anticorps destinés aux antigènes de surface ainsi qu'un marqueur de cellules mortes (LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, ThermoFisher), le tout suspendu dans du PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées et fixées par une incubation de 20 minutes avec la solution BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences). Après cette incubation, les cellules ont été

lavées et resuspendues dans une solution tampon contenant de la saponine et du FBS (Perm/wash buffer; BD biosciences) puis conservés la nuit à 4°C. Le lendemain, elles ont été à nouveau incubées pendant 30 minutes à 4°C avec le mélange d'anticorps destinés aux antigènes intracellulaires en solution avec le tampon contenant la saponine et le FBS. Enfin, après un lavage les cellules sont resuspendues dans une solution tampon de FACS (PBS contenant 1 % de FBS et 0,1 % d'azide de sodium) et 10 µl de billes de comptage CountBright™ (Invitrogen) ont été ajoutés pour chacun des échantillons. Des billes de compensation OneComp eBeads™ (Invitrogen) ont été préparées en parallèle pour tous les fluorochromes. L'acquisition a été faite sur un cytomètre en flux (LSR II, BD biosciences) à l'aide du logiciel BD FACSDiva (BD biosciences).

Toutes les étapes de centrifugation durant le protocole immunomarquage ont été faites à 2000 RPM pendant 3 minutes. La liste des anticorps utilisés est résumée dans le tableau III.

## **Analyse des données de cytométrie en flux**

Les analyses des données de cytométrie en flux ont été faites avec le logiciel FlowJo, version 10.5.3. Lors de l'acquisition, les compensations ont été calculées automatiquement par le logiciel FACSDiva (BD Biosciences) à l'aide de l'acquisition des billes de compensations. Les compensations ont été vérifiées et ajustées manuellement si nécessaire sur le logiciel FlowJo lors de l'analyse.

Pour générer les graphiques t-SNE, une réduction de la taille des échantillons a d'abord été effectuée, afin d'avoir une contribution uniforme de chacun (excepté pour

la souris 2 du donneur MS-4, sacrifié à J32 en raison d'un petit nombre de cellules). Cette réduction a été appliquée aux CD45 humain (hCD45) qui ont été identifiés après avoir appliqué les compensations et une stratégie de sélection appropriées. Ensuite tous les évènements hCD45<sup>+</sup> d'une même expérience ont été exportés sans les compensations dans un fichier unique. L'algorithme t-SNE a alors été appliqué en prenant en considération les paramètres compensés. Une itération de 1000, une perplexité de 20 et un Eta (*learning rate*) de 200 ont été appliqués.

## **Histologie cérébrale**

Les sections de tissu cérébral ont été faites à l'aide d'un cryostat Leica CM3050S (Leica Microsystems). Des sections de 7µm ont été coupées à -23 °C et ont été récoltées sur des lames de verre (Surgipath Micro slides Snowcoat X-tra™, Leica Biosystems). Les lames ont ensuite été séchées à l'air ambiant. Une fixation par immersion dans l'acétone pendant 20 secondes a été faite avant leur conservation à -80 °C.

Le jour de la coloration, les cellules ont été décongelées puis fixées pendant 45 minutes à température ambiante dans une solution de formaldéhyde 10%. Un lavage a été fait pendant 3 minutes dans du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées 4h dans solution de *luxol fast blue* constitué de 5 g de *Solvent Blue 38* (Sigm-Aldrich), 500 ml d'éthanol 95% et 0,25 ml d'acide acétique glacial. Une différenciation a ensuite été faite à l'aide d'un trempage rapide dans une solution réductrice composée de 1 g hydroquinone, 5 g sulfite de sodium et 100 ml d'eau distillée suivie de lavages sous l'eau courante. Puis les sections ont été incubées à température ambiante pendant 10

minutes dans une solution d'hématoxyline (Sigma-Aldrich). La différenciation qui a suivi a été faite par trempage rapide dans une solution d'alcool acide composée d'acide acétique à 1% et d'éthanol à 70 %. Les sections ont ensuite été trempées dans une solution basique d'hydroxyde de sodium à 0,05% et incubées dans l'éthanol à 95%. La coloration à l'éosine grâce à un trempage de 90 secondes dans une solution composée 100 ml d'éosine Y (Sigma-Aldrich), 50 ml d'acide acétique glaciale et 450 ml d'éthanol 80%. Un dernier lavage de 3 minutes a été fait dans de l'éthanol 95% puis les sections ont été déshydratées dans de l'éthanol pur pendant 4 minutes suivi d'un trempage rapide dans du toluène pur. Du milieu Entellan (Merck Millipore) a été utilisé pour monter les lames. L'acquisition d'images a été effectuée avec un microscope Leica BM6000 (Leica) et le logiciel OpenLab 4.0.4 (PerkinElmer).

## **Analyse et tests statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad™ PRISM 8 (GraphPad™ Software).

## Résultats

Une collaboration avec le laboratoire du Dr Elie Haddad et le laboratoire du Dr Lionel Carmant a permis de développer un modèle de souris humanisée d'encéphalite de Rasmussen (Kebir et al., 2018). C'est en se basant sur ce modèle que nous avons développé nos expériences pour tenter de mettre au point un modèle de souris humanisée de SEP.

### Reconstitution immune chez la souris NSG avec des PBMC humains de patients atteints de SEP

Dans un premier temps nous avons injecté un nombre prédéterminé variable de PBMC afin d'optimiser la quantité nécessaire pour la reconstitution immune chez la souris NSG. Pour cette première expérience, 10 souris irradiées ont reçu par voie intrapéritonéale des PBMC provenant de deux patients différents. Les différents groupes sont représentés dans le tableau IV.

Tableau IV. Groupes des différentes souris injectées avec les PBMC de patients atteints de SEP pour optimisation

Code d'échantillon de PBMC	Nombre de cellules injectées	Nombre de souris
MS-1	$1 \times 10^6$	2
MS-2	$1 \times 10^6$	5
MS-2	$2 \times 10^6$	2
MS-2	$6 \times 10^6$	1

L'analyse par cytométrie en flux des cellules immunitaires circulantes dans le sang a permis de démontrer que la reconstitution immunitaire est présente pour tous les animaux comme indiqué par un marquage anti-hCD45 (figure 1a-c). De plus, on observe que presque la totalité de ces hCD45 sont des lymphocytes T, comme le montre le marquage avec un anti-CD3 (figure 1a). Les prélèvements sanguins faits à

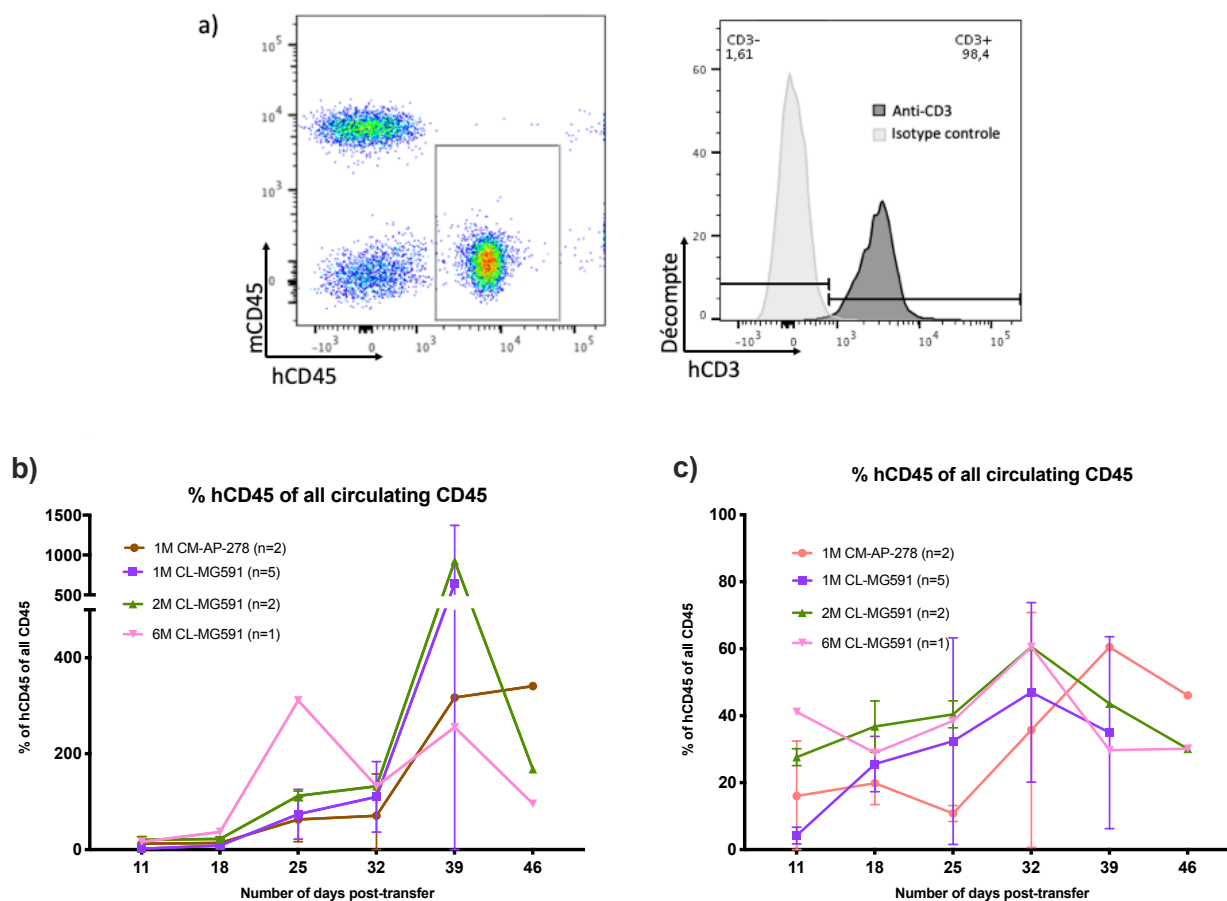


Figure 1. **Évaluation par cytométrie en flux de la reconstitution immunitaire.**

Évaluation par cytométrie en flux de la reconstitution immunitaire chez la souris NSG après transfert par voie intrapéritonéale de 1,2, ou 6 millions de PBMC provenant de 2 patients atteints de SEP (MS-1 et MS-2) a) Graphique représentatif de l'analyse des cellules immunitaires provenant du sang périphérique b) et c) Nombre relatif et absolu de hCD45 circulant dans le sang périphérique en fonction du nombre de jours post-transfert pour les différents groupes de souris ayant reçu 1,2, ou 6 millions de PBMC. Moyenne +/- SEM.

11 et 18 jours après le transfert des cellules immunitaires ont mis en évidence que, dans les premières semaines, seulement un faible nombre de cellules humaines circulantes sont détectables, moins de 25 hCD45/  $\mu$ l de sang, peu importe le nombre de cellules transférées initialement. Une augmentation plus marquée est observée après la troisième semaine pour tous les groupes (figure 1b). Cependant, lorsqu'on regarde la valeur relative au nombre total de cellules CD45, murines et humaines, on remarque que les cellules hCD45 sont présentes en bonne proportion même dans les premières semaines suivant le transfert. Ceci démontre donc, qu'à ce moment, la reconstitution immunitaire est déjà présente.

Cette première expérience a permis de démontrer, dans un premier temps, que les PBMC décongelés provenant de patients atteints de SEP peuvent induire une reconstitution immunitaire chez la souris NSG et, dans un deuxième temps, que la cinétique de la reconstitution immunitaire ne semble pas dépendre de la quantité de PBMC transférés. Pour les expériences qui ont suivi, un million de cellules ont été transférées aux souris.



# Caractéristiques cliniques des souris NSG avec reconstitution immune avec PBMC humains

## Évaluation de la prise pondérale

Dans le modèle de EAE classique, la perte de poids est un indicateur important de la maladie. Nous avons donc suivi de façon quotidienne la prise pondérale de toutes les souris. De plus, ceci a permis aussi de suivre la sévérité de la GVHD que présentaient les souris. La figure 2 représente des exemples de courbes de poids représentatives des groupes de souris injectées avec des PBMC de patient avec SEP (groupe SEP) et des groupes de souris injectées avec des PBMC de sujets sains (groupe CTRL). De façon générale, la plupart des souris avaient une prise pondérale graduelle tant dans le groupe SEP que dans le groupe CTRL.

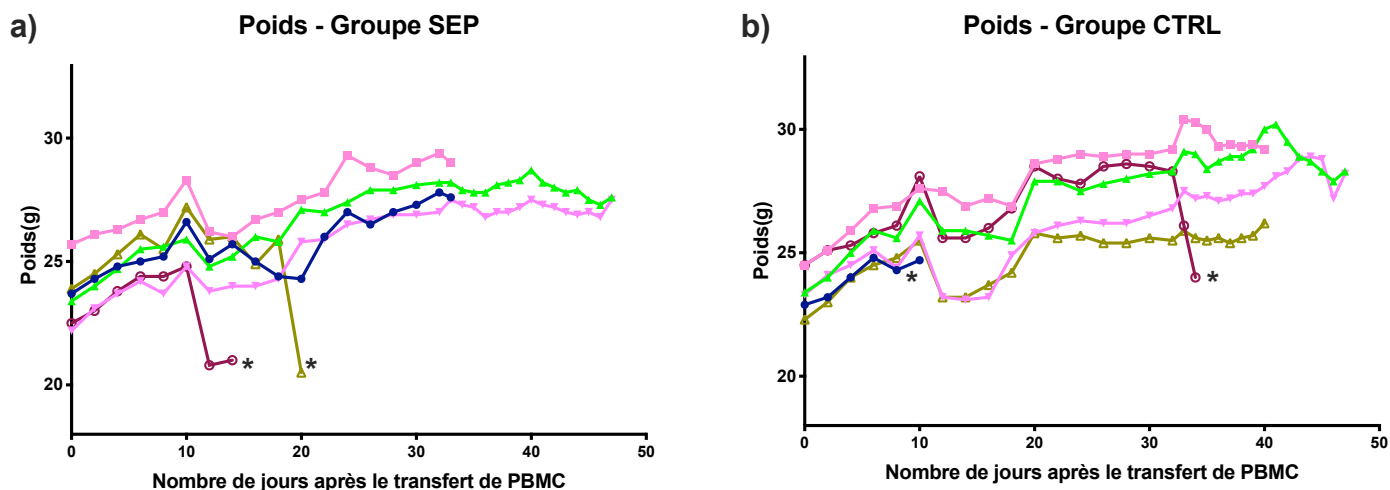


Figure 2. Courbe de suivi de la prise pondérale.

Courbe de suivi de la prise pondérale suivant l'injection intrapéritonéale de 10<sup>6</sup> PBMC. Ces courbes sont représentatives des différentes expériences. a) Groupe SEP (n=6); b) Groupe CTRL (n=6). Les étoiles représentent les animaux qui ont été sacrifiés ou qui sont décédés prématurément en raison d'un GVHD trop importante.

## **Mortalité**

Comme le montre la figure 2, une faible partie des souris sont décédées prématurément ou ont été sacrifiées en raison d'une GVHD trop importante. Cette importante GVHD a été notée autant dans les groupes SEP que dans les groupes CTRL et ce pour différents donneurs. Elle touchait entre 0 et 20% de chacun des groupes.

## **Score clinique**

Le suivi clinique quotidien nous a permis de démontrer que les souris NSG dont la reconstitution immune a été faite à partir de PBMC de patients atteints de SEP ne présentent pas de symptôme clinique suggérant une atteinte démyélinisante. Les scores cliniques d'EAE typique sont restés à 0 pour toutes les souris. Cliniquement, les souris n'ont présenté que des signes cliniques de GVHD autant dans les groupes SEP que dans les groupes CTRL.

## L'histologie du SNC des souris NSG avec reconstitution immune avec PBMC de patient SEP.

Bien que cliniquement les souris ne présentaient pas de symptômes suggérant une atteinte démyélinisante nous avons confirmé l'absence de démyélinisation en procédant à une coloration de la myéline par Luxol fast blue-Eosin/hematoxylin. La figure 3 montre deux sections représentatives de l'étude histopathologique qui a été faite. Cette expérience a permis de démontrer qu'aucune démyélinisation n'est présente, et ce même à distance du transfert de cellules immunitaires.

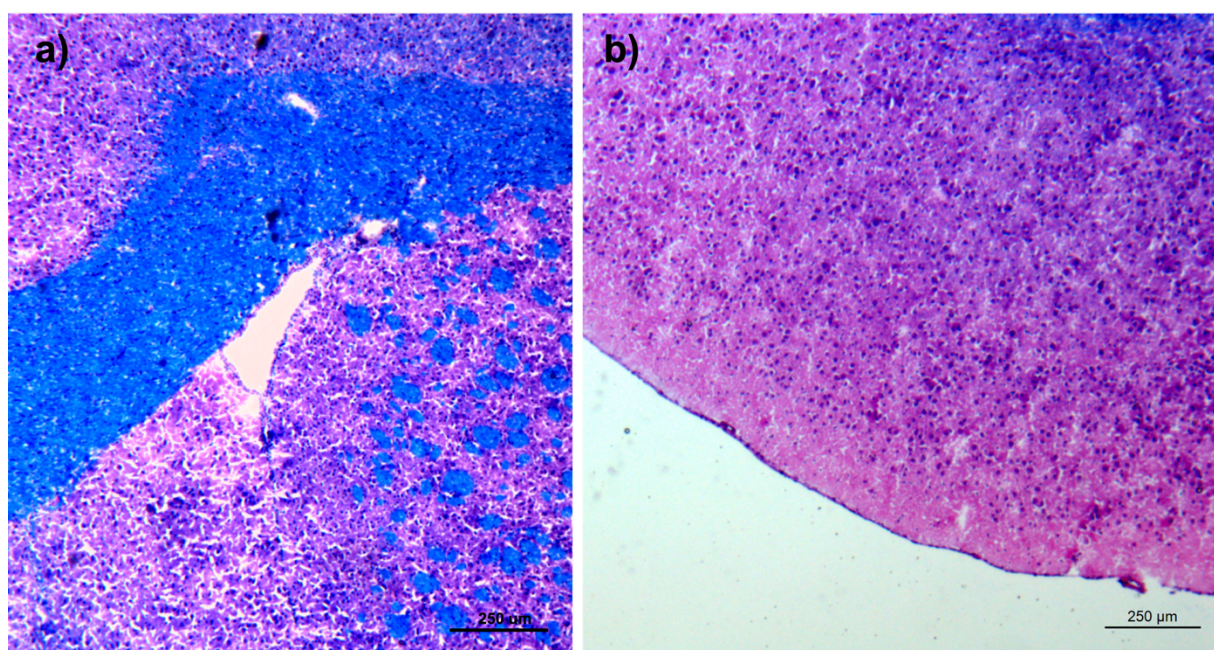


Figure 3. **Histologie du tissu cérébral.**

Image représentative de l'étude par Luxol fast blue-Eosin/hematoxylin montrant l'absence de démyélinisation. Sections de tissu cérébral obtenu 39 jours après le transfert intrapéritonéal de  $10^6$  de PBMC provenant d'un patient atteint de SEP(MS-1) dans la souris NSG. Coupe de 7 µm. a) Section au niveau de la portion latérale du corps calleux incluant une portion du ventricule latéral et du stratum b) Section au niveau cortical.

## **Caractérisation des cellules immunitaires humaines infiltrant le SNC des souris NSG avec reconstitution immune avec PBMC humains**

Une infiltration de cellules immunitaire au sein du parenchyme cérébral est nécessaire pour induire l'inflammation qui précède la démyélinisation chez les patients atteints de SEP et dans le modèle de souris EAE. Dans notre modèle, des cellules immunitaires ont pu être isolées à partir du SNC des souris qui ont servi à l'optimisation de la quantité de PBMC à injecter. Les expériences qui ont suivi ont porté sur caractérisation de cet infiltrat, la prochaine étape logique dans l'étude de notre modèle.

Pour ce faire, nous avons procédé à deux expériences consécutives, chacune avec des donneurs différents atteints de SEP (MS-3 et MS-4) et des contrôles différents (CTRL-2 et CTRL-3). Un total de 35 souris avec reconstitution immune humaine ont été analysées à des moments précis; soit à 18 (MS-3; CTRL-2), 25 (MS-3; CTRL-2 et MS-4; CTRL-3), 32 (MS-3; CTRL-2 et MS-4; CTRL-3) et 39 (MS-3; CTRL-2) jours suivant le transfert de PBMC.

### **Immunophénotype des PBMC utilisés pour la reconstitution**

La caractérisation des PBMC utilisés pour la reconstitution immune a été faite par cytométrie en flux. Comme le démontre la figure 4, les cellules exprimant le CD3, caractéristique des lymphocytes T, constituaient entre 54% et 74% des CD45 pour les différents donneurs. Les lymphocytes B qui peuvent être définis comme les cellules n'exprimant pas le CD3 mais exprimant le CD19, représentaient entre 8,6% et 6,3% des CD45. Les cellules exprimant le CD11c, mais négative pour le CD3, identifiant un

groupe plus hétérogène de cellules, incluant ici les monocytes et les *natural killer cells* (NK) représentent entre 11,3% et 24,7% des cellules CD45+. La composition de nos échantillons comporte les proportions attendues (Kleiveland, 2015).

Enfin, le ratio CD4 :CD8 a été calculé pour les donneurs. Celui-ci se situe entre 1,17 et 2,16, ce qui est comparable à ce qui est décrit dans la littérature (Stüve et al., 2006).

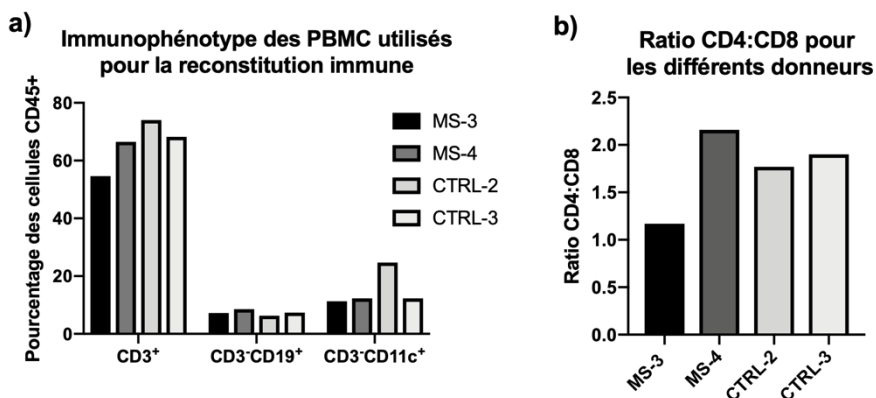


Figure 4. Immunophénotype des PBMC des donneurs.

Immunophénotype des PBMC des quatre donneurs (MS-3, MS-4, CTRL-2 et CTRL-3) qui ont été utilisés pour la reconstitution immune chez la souris NSG pour les expériences de caractérisation de l'infiltrat cellulaire au sein du SNC. **a)** Proportion des cellules CD45<sup>+</sup> exprimant différents marqueurs de surface d'intérêt. **b)** Ratio CD4:CD8 pour chacun des donneurs. Étude faite par cytométrie en flux sans stimulation préalable des cellules.

## Quantification de l'infiltration

Les cellules immunitaires infiltrant le SNC ont été isolées par dissociation tissulaire enzymatique suivie d'un gradient de Percoll™. La comparaison de l'infiltration cellulaire dans les différents groupes de souris a ensuite été effectuée par deux méthodes quantitatives. La première est le décompte des cellules à la fin du processus d'isolation et la seconde est un décompte cellulaire par cytométrie en flux utilisant des billes de comptage fluorescentes. Le décompte cellulaire à la fin de l'isolation a été fait

à l'hématimètre avec une coloration de bleu de trypan. Étant donné que le nombre de cellules isolées à partir des SNC des souris se situe aux alentours de  $10^5$  dans un petit volume (200-300  $\mu$ l), la concentration de la suspension cellulaire finale n'est pas optimale pour obtenir des valeurs précises au décompte par hématimètre. C'est pourquoi nous avons aussi utilisé les billes de comptage en cytométrie en flux pour comparer quantitativement l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC des

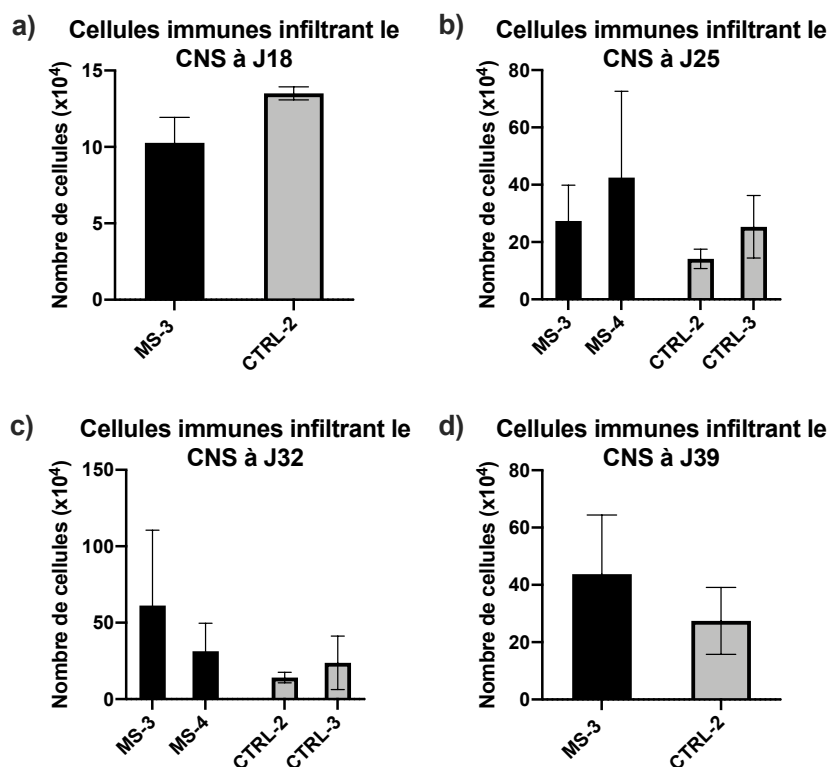


Figure 5. **Décompte cellulaire à l'hématimètre.**

Décompte à l'hématimètre des cellules immunitaires infiltrant le SNC chez les souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC de sujet atteint de SEP (MS-3 et MS-4) ainsi que de sujet sain (CTRL-2 et CTRL-3); **a)** 18 jours, **b)** 25 jours, **c)** 32 jours et **d)** 39 jours après l'injection intrapéritonéale de  $10^6$  PBMC. (n=3 pour MS-3 et CTRL-2 à J18, J25, J32, J39, n=3 pour MS-4 à J25 et J32, n=3 pour CTRL-3 à J25 et n=4 pour CTRL-3 à J32). L'échelle de l'axe des Y est différente pour chacun des graphiques afin de permettre une meilleure appréciation de la différence entre les groupes. Moyenne  $\pm$  SEM.

différentes souris. Au dernier moment, les billes ont été ajoutées aux échantillons destinés à la cytométrie en flux effectuée sur toutes les cellules recueillies par le processus d'isolation. Comme les échantillons ont été stimulés pour permettre l'immunomarquage intracellulaire de cytokines, ce qui est processus qui est associé à une certaine perte cellulaire, le décompte fait avec les billes par cytométrie en flux ne

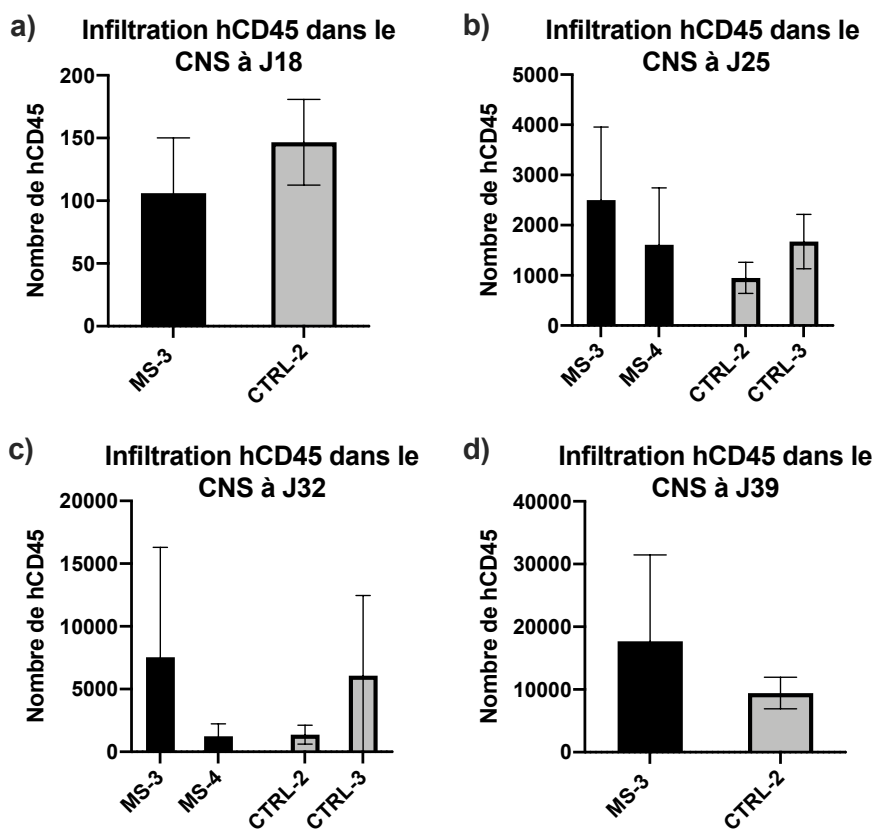


Figure 6. **Décompte cellulaire avec billes de comptage par cytométrie en flux.**

Mesure avec billes de comptage par cytométrie en flux du nombre de hCD45 infiltrant le SNC chez les souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC de sujets atteints de SEP (MS-3 et MS-4) ainsi que de sujet sain (CTRL-2 et CTRL-3); **a)** 18 jours, **b)** 25 jours, **c)** 32 jours et **d)** 39 jours après l'injection intrapéritonéale de  $10^6$  PBMC. (n=3 pour MS-3; MS-4; CTRL-2 à J18, J25, J32, J39. n=3 pour CTRL-3 à J25 et n=4 pour CTRL-3 à J32). L'échelle de l'axe des Y est différente pour chacun des graphiques afin de permettre une meilleure appréciation de la différence entre les groupes. Moyenne +/- SEM.

représente pas le nombre absolu de cellules initialement présent dans l'échantillon. Cependant, tous les échantillons étant exposés au même traitement, cette technique permet une comparaison juste entre ceux-ci. Le nombre de hCD45 présent dans chacune des suspensions cellulaires a ainsi été comparé.

Comme le montrent les figures 5 et 6, l'infiltrat cellulaire au sein du SNC 18 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC est déjà présent, mais quantitativement très faible lorsqu'on le compare à 25, 32 et 39 jours après l'injection de PBMC. On remarque aussi que globalement aucune différence ou tendance ne peut être observée en ce qui a trait à la comparaison quantitative de l'infiltrat de cellules immunitaires au sein du SNC des souris NSG ayant reçu des PBMC provenant de patients atteints de SEP versus celles ayant reçu des PBMC de sujets sains. Les résultats de cette expérience suggèrent que l'infiltrat chez nos souris s'installe de façon graduelle après l'injection intrapéritonéale de PBMC et que cet infiltrat, d'un point de vue quantitatif, est indépendant du statut du donneur (SEP vs sujet sain).

### **Analyse qualitative de l'infiltration cellulaire au sein du SNC**

L'étude qualitative de l'infiltrat de cellules immunitaires au sein du parenchyme cérébral était nécessaire, et ce même en l'absence d'une différence quantitative dans nos différents groupes de souris. En effet, l'objectif était de caractériser les différentes compositions des sous-types cellulaires et à leurs profils de sécrétion de cytokines dans les différents groupes une fois que les cellules aient pénétré le SNC de la souris et donc qu'elles aient été exposées aux antigènes cérébraux murins.



## **Utilisation d'une technique de réduction de dimension pour étudier et comparer l'immunophénotype des cellules infiltrant le SNC dans les différents groupes de souris.**

Nous avons utilisé une technique non biaisée d'analyse des données de cytométrie en flux pour comparer l'immunophénotype des cellules infiltrant le SNC. Nous avons donc appliqué une technique de réduction de dimension, *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE) pour représenter schématiquement les cellules et leurs caractéristiques afin de dégager les différences et les similarités au travers des différents groupes. Cette analyse a été faite pour les hCD45 recueillie 25 jours et 32 jours après l'injection de PBMC chez la souris NSG. Les figures 7 à 10 représentent les différents graphiques t-SNE de ces expériences.

Avec cette analyse, nous pouvons constater visuellement qu'il ne semble pas y avoir de différence permettant de distinguer nos groupes en ce qui a trait au phénotype des hCD45 ayant infiltré le SNC. On note cependant que, de façon isolée, pour certaines souris il semble y avoir une expansion plus importante de certains sous-types cellulaire sans que cela soit clairement un effet lié au donneur. Ceci est particulièrement évident pour la souris 1 (donneur MS-3) et souris 5 (donneur CTRL-2) 32 jours après l'injection de PBMC (figure 9) chez qui une expansion plus importante des cellules CD8 et CD4 respectivement est mise en évidence, sans qu'on puisse retrouver cette tendance chez les autres souris ayant reçu les mêmes PBMC.

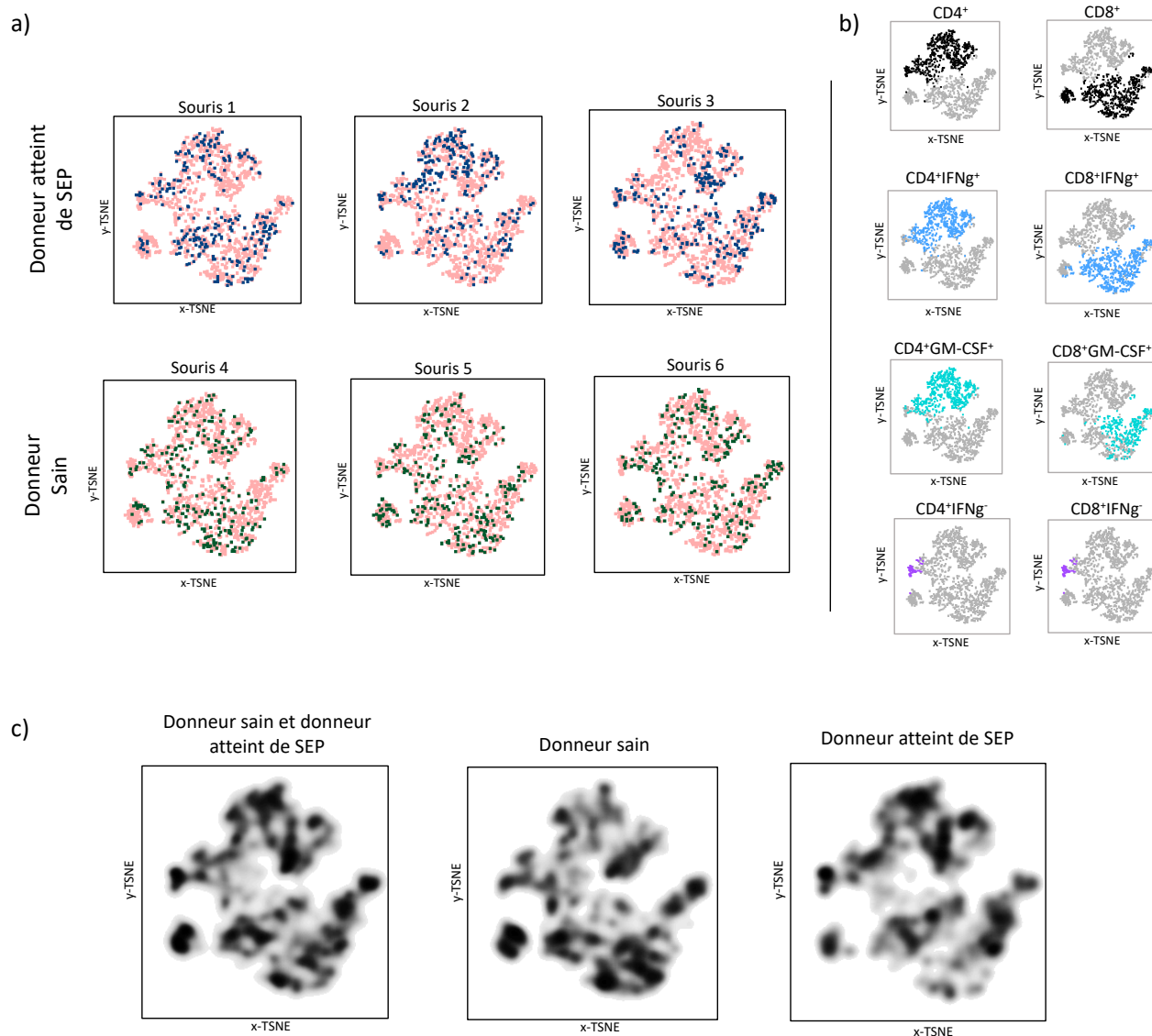


Figure 7. **Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC à j25 (MS-3 et CTRL-2).**

Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC chez les souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC d'un sujet atteint de SEP (MS-3) ainsi que de sujet sain (CTRL-2). Les cellules ont été récoltées 25 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC. a) Distribution des cellules provenant des souris injectées avec des PBMC du donneur atteint de SEP en bleu foncé (rangée supérieure) et celles provenant des souris injectées avec des PBMC de sujets sains en vert foncé (rangée inférieure). Sur le graphique t-SNE, le rose représente l'ensemble des cellules infiltrant le SNC pour cette expérience. b) Localisation de diverses populations sur le graphique t-SNE. c) Graphique de densité représentant l'ensemble des hCD45 infiltrant le SNC analysées (gauche), seulement les hCD45 provenant des souris ayant reçu les PBMC du donneur sain (centre) et les hCD45 provenant des souris ayant reçu des PBMC du patient atteint de SEP.

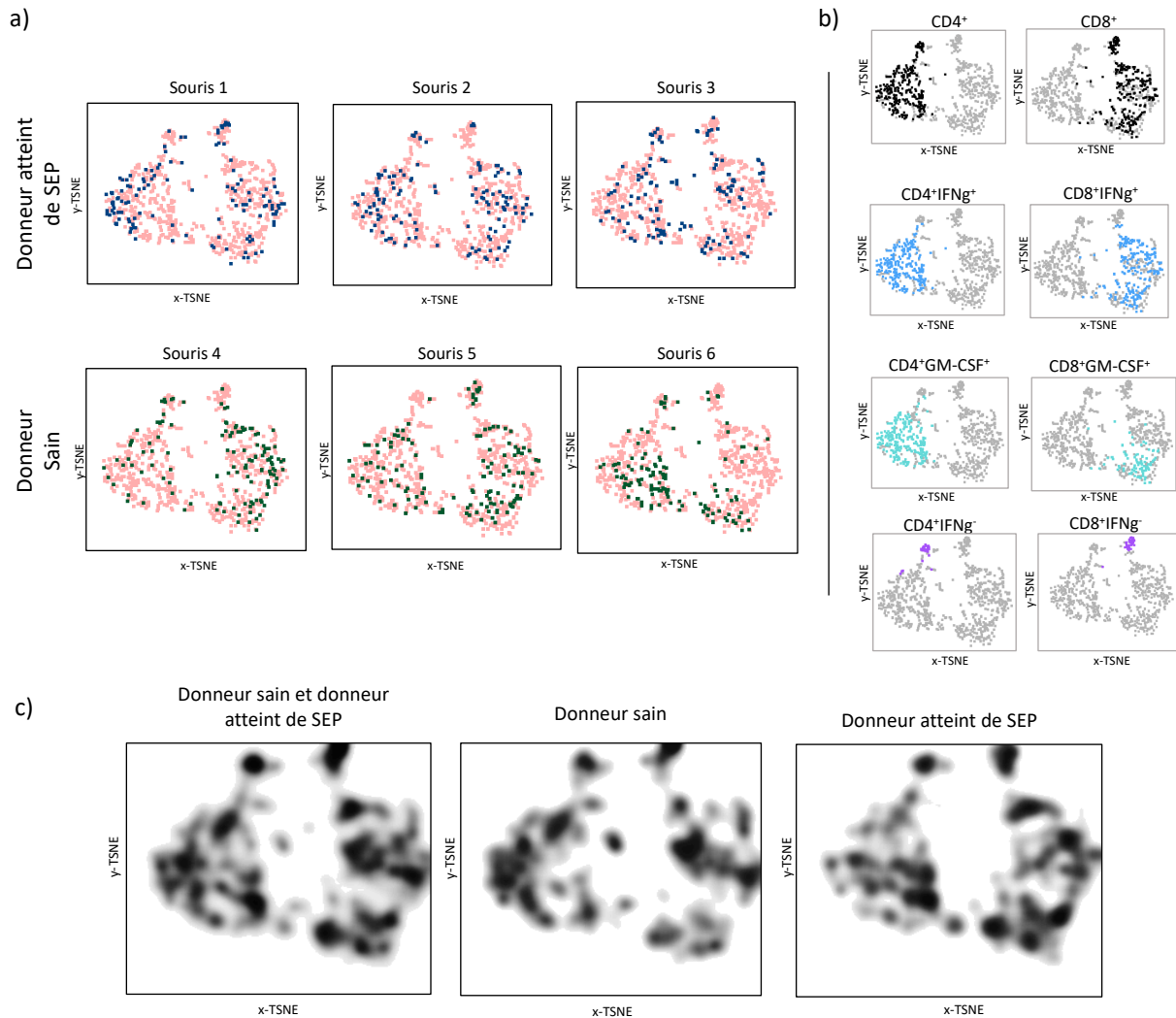


Figure 8. **Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC à j25 (MS-4 et CTRL-3).**

Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC chez les souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC d'un sujet atteint de SEP (MS-4) ainsi que de sujet sain (CTRL-3). Les cellules ont été récoltées 25 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC. **a)** Distribution des cellules provenant des souris injectées avec des PBMC du donneur atteint de SEP en bleu foncé (rangée supérieure) et celles provenant des souris injectées avec des PBMC de sujet sain en vert foncé (rangée inférieure). Sur le graphique t-SNE, le rose représente l'ensemble des cellules infiltrant le SNC pour cette expérience. **b)** Localisation de diverses populations sur le graphique t-SNE. **c)** Graphique de densité représentant l'ensemble des hCD45 infiltrant le SNC analysées (gauche), seulement les hCD45 provenant des souris ayant reçu les PBMC du donneur sain (centre) et les hCD45 provenant des souris ayant reçu des PBMC du patient atteint de SEP.

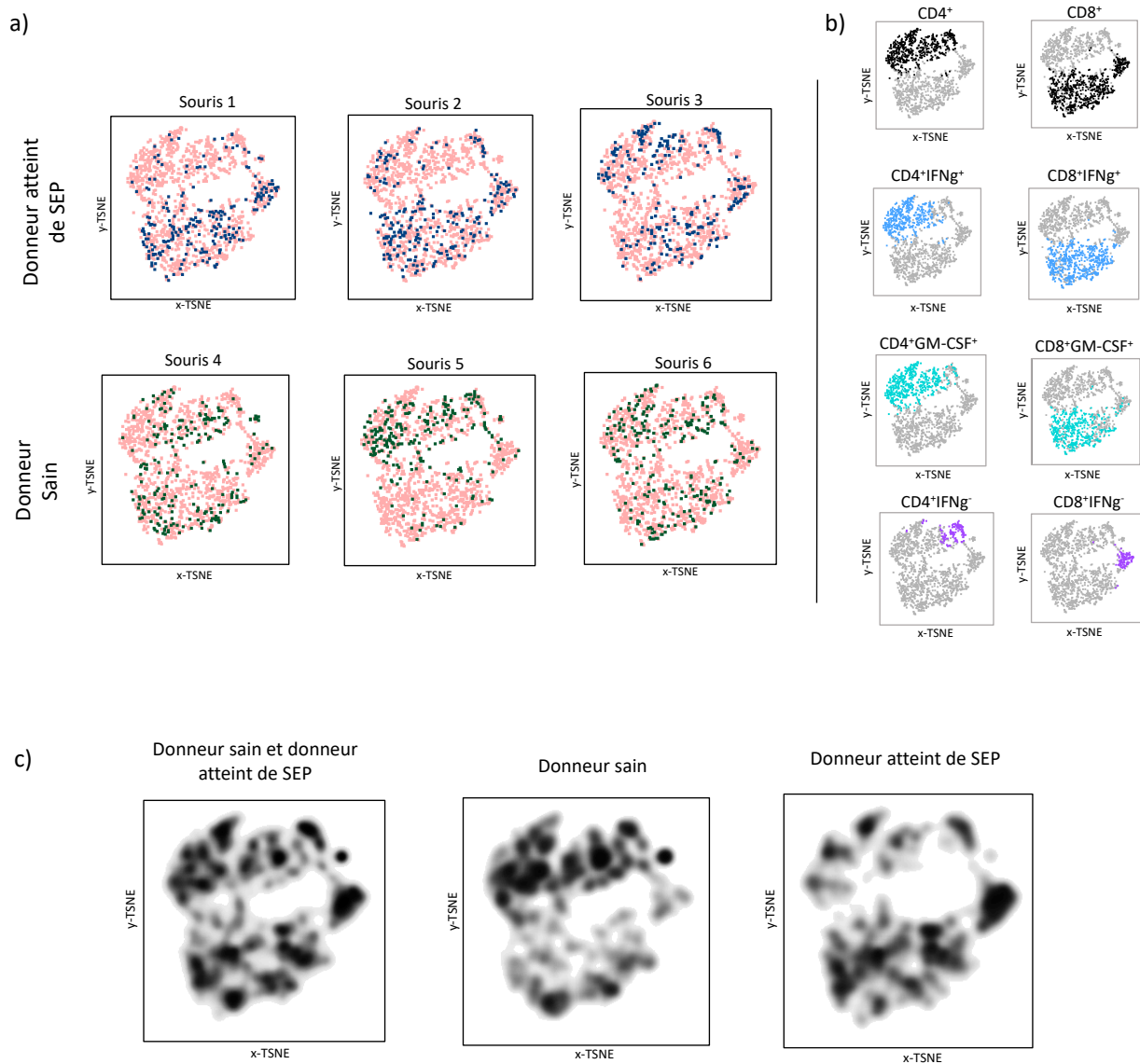


Figure 9. **Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC à j32 (MS-3 et CTRL-2).**

Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC chez les souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC d'un sujet atteint de SEP (MS-3) ainsi que de sujet sain (CTRL-2). Les cellules ont été récoltées 32 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC. a) Distribution des cellules provenant des souris injectées avec des PBMC du donneur atteint de SEP en bleu foncé (rangée supérieure) et celles provenant des souris injectées avec des PBMC de sujet sain en vert foncé (rangée inférieure). Sur le graphique t-SNE, le rose représente l'ensemble des cellules infiltrant le SNC pour cette expérience. b) Localisation de diverses populations sur le graphique t-SNE. c) Graphique de densité représentant l'ensemble des hCD45 infiltrant le SNC analysés (gauche), seulement les hCD45 provenant des souris ayant reçu les PBMC du donneur sain (centre) et les hCD45 provenant des souris ayant reçu des PBMC du patient atteint de SEP.

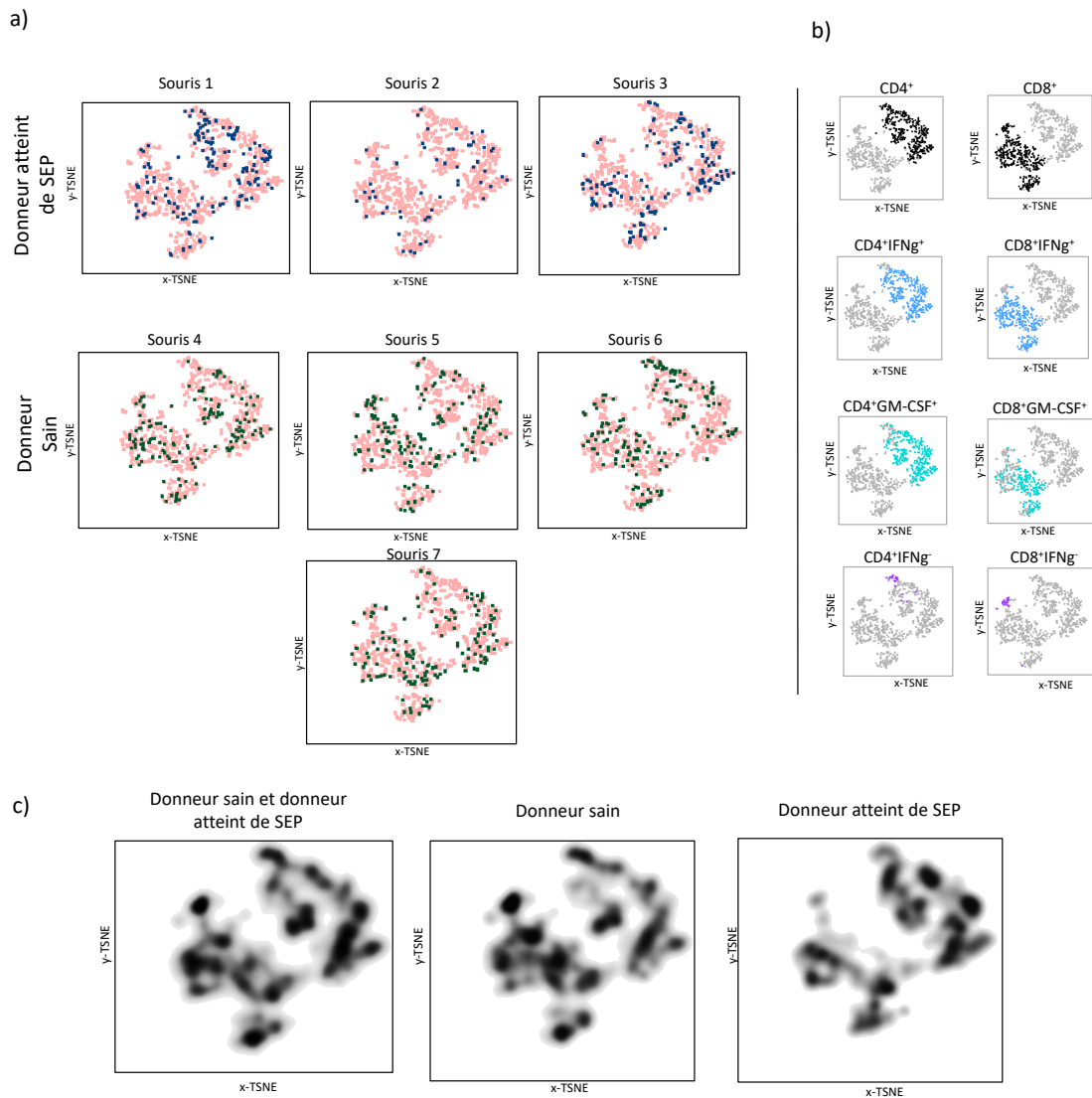


Figure 10. **Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC à j32 (MS-4 et CTRL-3).**

Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 infiltrant le SNC chez les souris NSG avec reconstitution immune provenant de PBMC d'un sujet atteint de SEP (MS-4) ainsi que de sujet sain (CTRL-3). Les cellules ont été récoltées 32 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC. a) Distribution des cellules provenant des souris injectées avec des PBMC du donneur atteint de SEP en bleu foncé (rangée supérieure) et celles provenant des souris injectées avec des PBMC de sujet sain en vert foncé (rangée inférieure). Sur le graphique t-SNE, le rose représente l'ensemble des cellules infiltrant le SNC pour cette expérience. b) Localisation de diverses populations sur le graphique t-SNE. c) Graphique de densité représentant l'ensemble des hCD45 infiltrant le SNC analysées (gauche), seulement les hCD45 provenant des souris ayant reçu les PBMC du donneur sain (centre) et les hCD45 provenant des souris ayant reçu des PBMC de patient atteint de SEP.

Ainsi, cette analyse a mis en évidence qu'il ne semble pas y a avoir d'immunophénotype distinct entre les hCD45 infiltrant le SNC provenant de nos deux groupes de donneurs. De plus, cette analyse a révélé une variabilité en ce qui a trait à l'immunophénotype des cellules infiltrant le SNC chez les souris dont la reconstitution immune provient des mêmes PBMC.

### **Comparaison de certains sous-types cellulaires infiltrant le SNC dans les différents groupes de souris.**

Pour confirmer les observations faites avec l'analyse précédente, nous avons procédé une analyse quantitative de certains sous-types cellulaires. Les figures 11 à 13 synthétisent cette analyse. Nous avons ainsi confirmé l'absence de différence dans le phénotype des cellules infiltrant le SNC dans nos deux groupes, tant au niveau des marqueurs de surface, qu'au niveau de leur profil de sécrétion de cytokines.

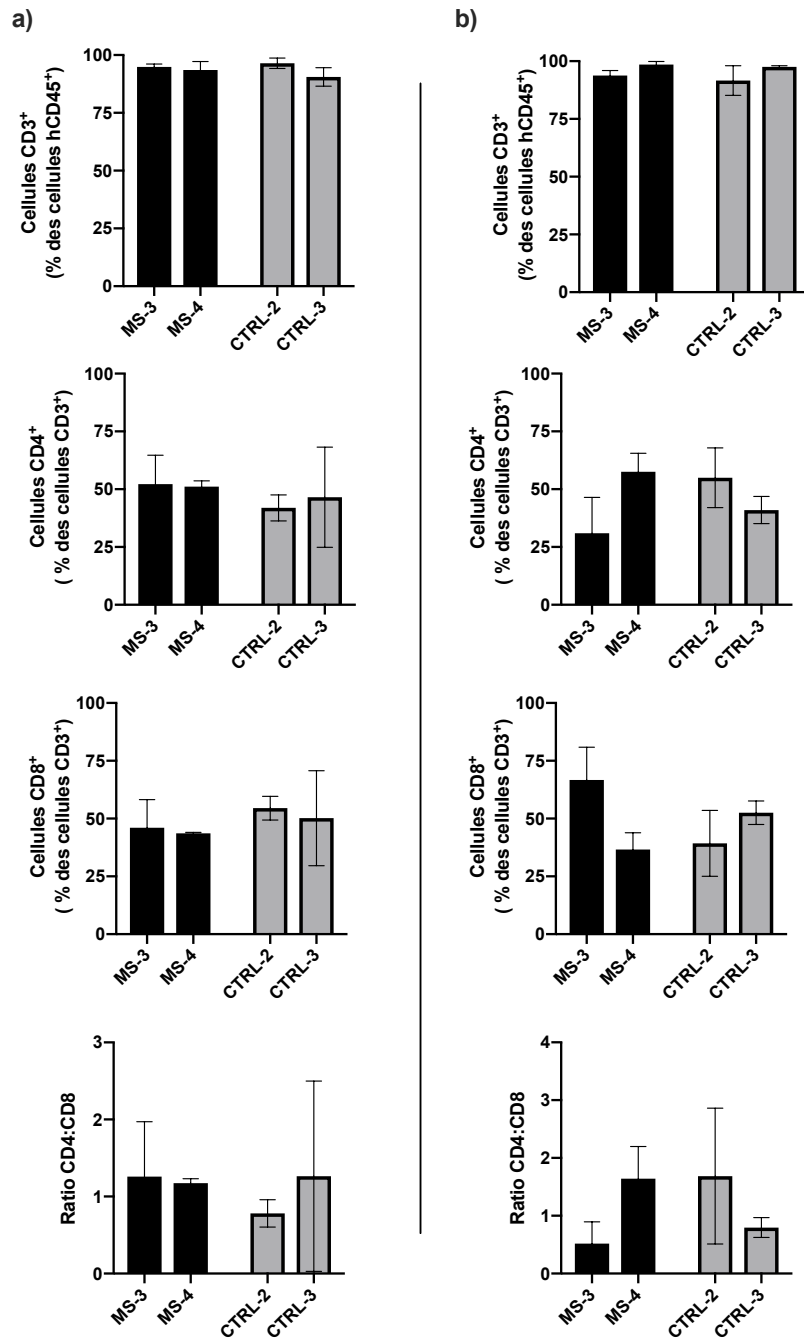


Figure 11. **Phénotype des cellules immunitaires infiltrant le SNC.**

Caractérisation des antigènes de surface des cellules immunitaires infiltrant le SNC chez souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC de sujets atteints de SEP (MS-3; MS-4) ainsi que de sujets sains (CTRL-2; CTRL-3). Cellules isolées du SNC **a)** 25 jours et **b)** 32 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC. (n=3 pour MS-3; MS-4; CTRL-2 à J25 et J32. n=3 pour CTRL-3 à J25 et n=4 pour CTRL-3 à J32).

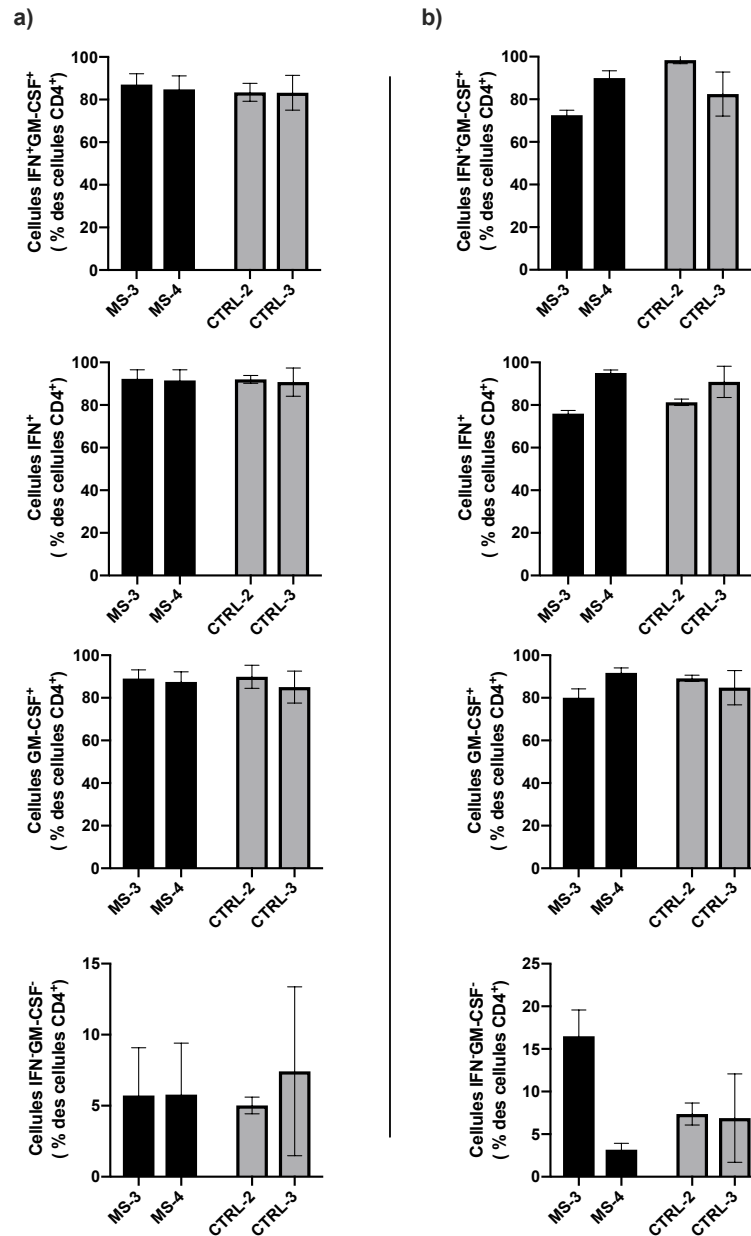


Figure 12. Profil de sécrétion de IFN $\gamma$  et GM-CSF des cellules immunitaires CD4<sup>+</sup> infiltrant le SNC.

Caractérisation du profil de sécrétion de IFN $\gamma$  et GM-CSF des cellules immunitaires CD4<sup>+</sup> infiltrant le SNC chez souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC de sujets atteints de SEP (MS-3; MS-4) ainsi que de sujets sains (CTRL-2; CTRL-3). Cellules isolées du SNC **a)** 25 jours et **b)** 32 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC (n=3 pour MS-3; MS-4; CTRL-2 à J25 et J32 n=3 pour CTRL-3 à J25 et n=4 pour CTRL-3 à J32).



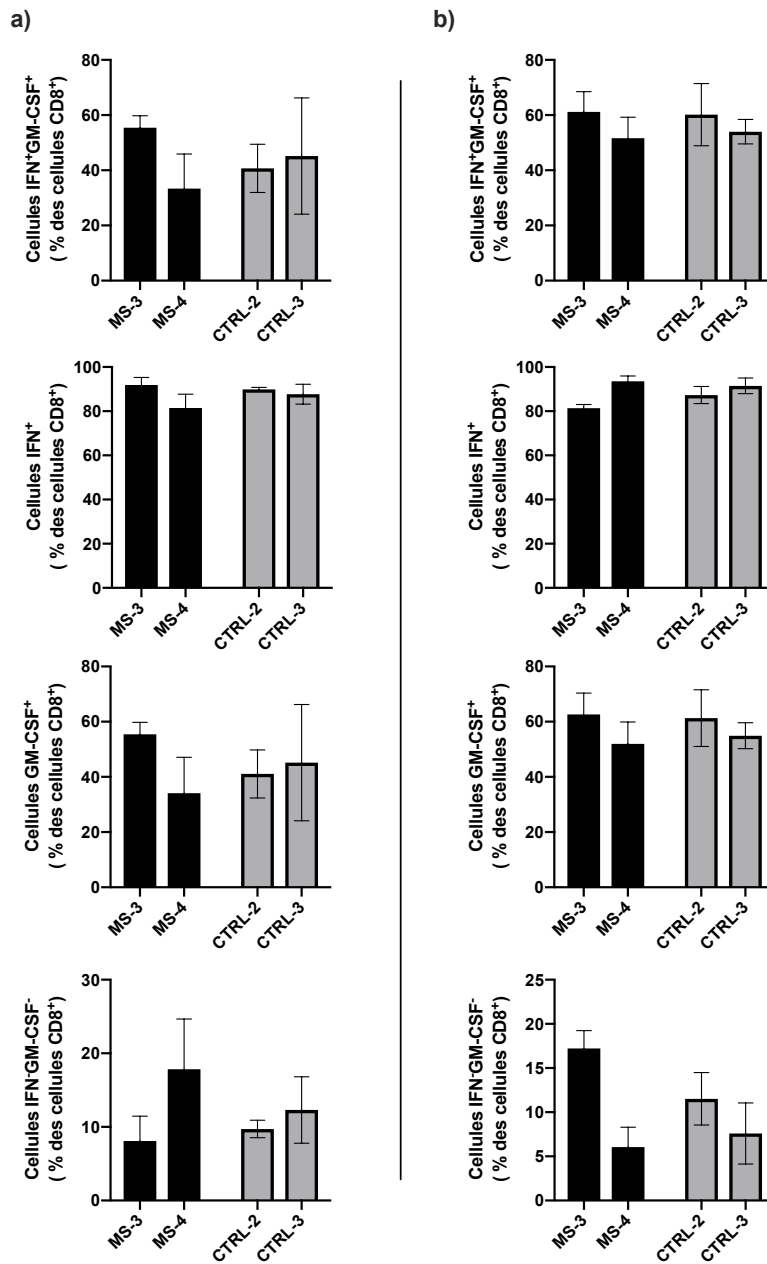


Figure 13. Profil de sécrétion d'IFN $\gamma$  et GM-CSF des cellules immunitaires CD8 $^+$  infiltrant le SNC.

Caractérisation du profil de sécrétion de IFN $\gamma$  et GM-CSF des cellules immunitaires CD4 $^+$  infiltrant le SNC chez souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC de sujets atteints de SEP (MS-3; MS-4) ainsi que de sujets sains (CTRL-2; CTRL-3). Cellules isolées du SNC a) 25 jours et b) 32 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC. (n=3 pour MS-3; MS-4; CTRL-2 à J25 et J32 n=3 pour CTRL-3 à J25 et n=4 pour CTRL-3 à J32).

## **Les cellules immunitaires provenant de la rate ont un immunophénotype distinct de celles infiltrant le SNC**

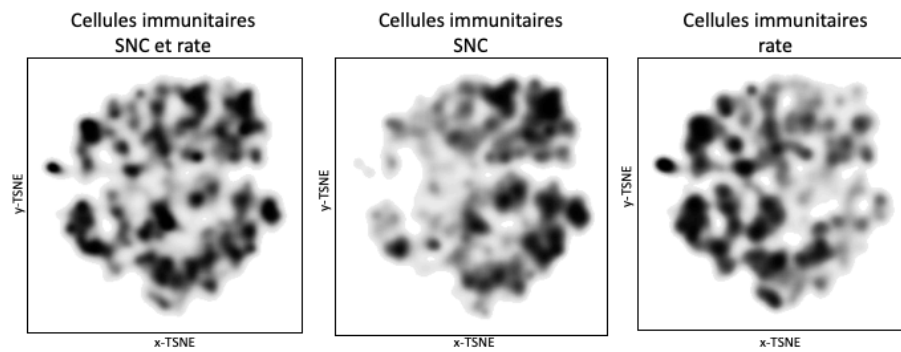
Enfin, nous avons aussi étudié le phénotype des cellules immunitaires se retrouvant au niveau de la rate en les comparant avec celles se retrouvant au sein du SNC, et ce peu importe le statut du donneur de PBMC.

Nous avons donc procédé à une analyse t-SNE des données obtenues par cytométrie en flux. Les figures 14 à 17 représentent les graphiques t-SNE pour les différentes expériences.

Comme le montre les graphiques de densité, un certain gradient est observable entre les cellules provenant de la rate et celles provenant du SNC, et ce de façon constante pour toutes les expériences. Ceci démontre qu'il existe une différence dans l'immunophénotype des cellules pour ces deux groupes. L'analyse t-SNE suggère que les caractéristiques qui génèrent ce gradient sont la production plus importante de GM-CSF, et dans une moindre mesure celle d'IFN $\gamma$ , par les cellules immunes ayant été isolées à partir du SNC, tant au niveau des CD4 que des CD8.

Nous avons donc procédé à une analyse quantitative spécifique pour ces sous-populations et avons démontré une différence significative entre les lymphocytes provenant de la rate et du SNC pour la production de GM-CSF par les CD4 et CD8, 25 jours et 32 jours suivant l'injection intrapéritonéale de PBMC. Une différence significative est aussi présente entre les cellules provenant de la rate et du SNC pour la production d'IFN $\gamma$  par les CD4 25 jours après l'injection de PBMC et par les CD8 25 jours et 32 jours après l'injection de PBMC (figure 18 et 19).

a)



b)

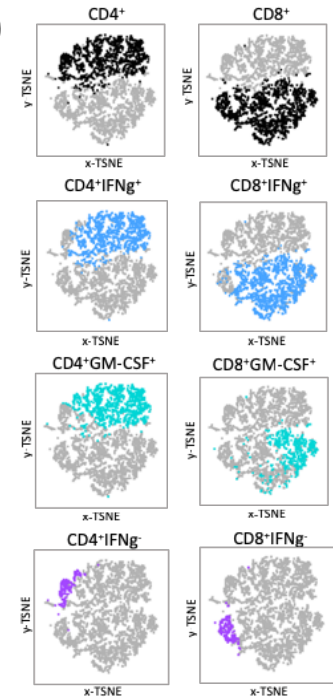


Figure 14. Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC à j25 (MS-3 et CTRL-2).

Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC de la souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC MS-3 (n=3) et CTRL-2 (n=3) 25 jours après l'injection intrapéritonéale de ces PBMC. **a)** Graphique de densité représentant l'ensemble des cellules analysées (gauche), seulement le SNC (centre) et seulement la rate (droite). **b)** Localisation de diverses populations sur le graphique t-SNE.

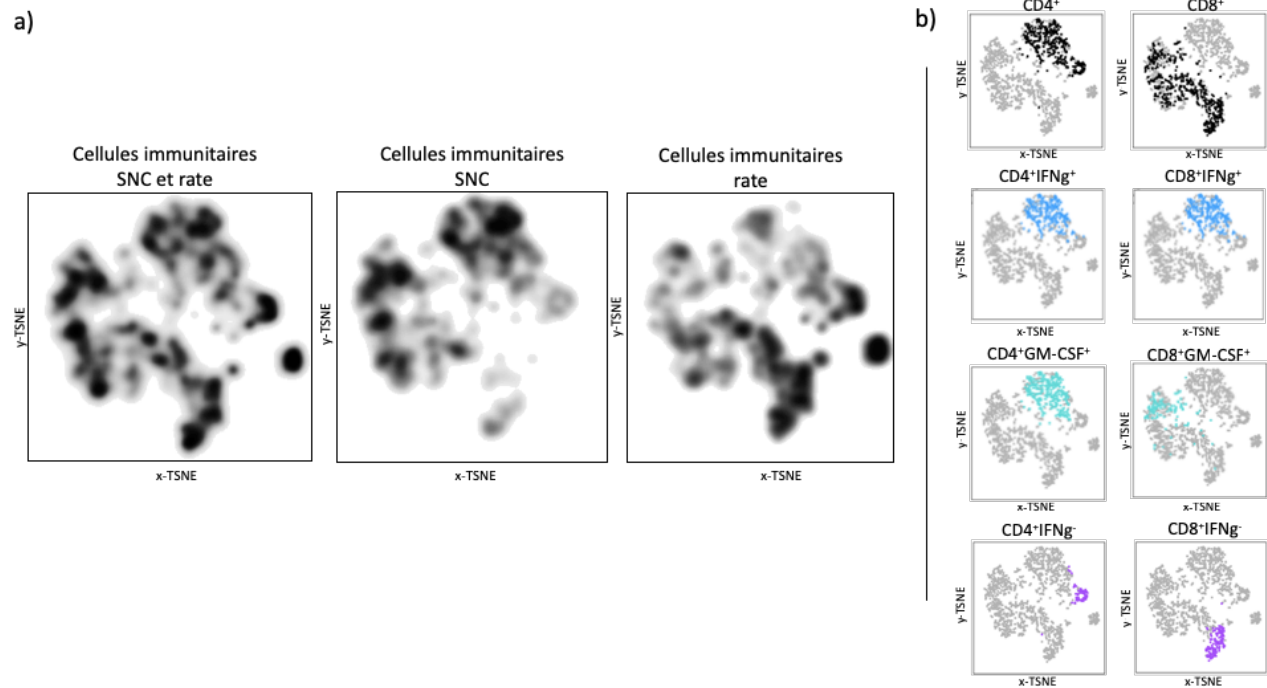


Figure 15. **Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC à j25 (MS-4 et CTRL-3).**

Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC de la souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC MS-4 (n=3) et CTRL-3 (n=3) 25 jours après l'injection intrapéritonéale de ces PBMC. a) Graphique de densité représentant l'ensemble des cellules analysées (gauche), seulement le SNC (centre) et seulement la rate (droite). b) Localisation de diverses populations sur le graphique t-SNE.

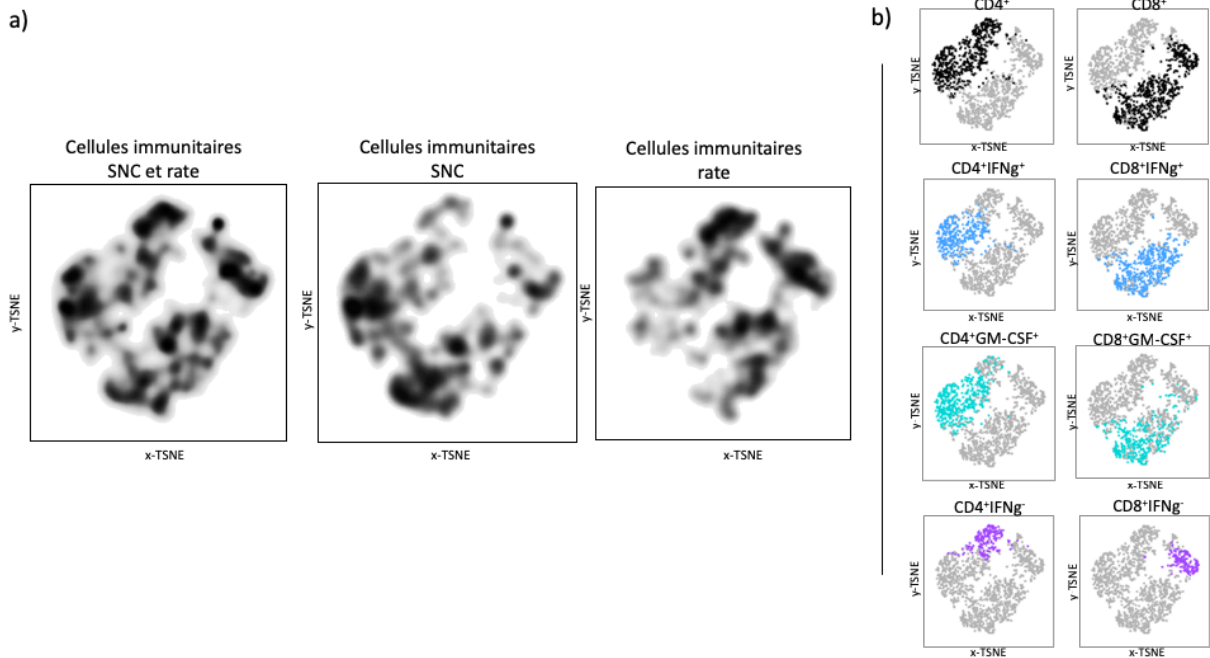


Figure 16. **Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC à j32 (MS-3 et CTRL-2).**

Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate de du SNC de la souris NSG avec reconstitution immune provenant de PBMC MS-3 (n= 3) et CTRL-2 (n=3) 32 jours après l'injection intrapéritonéale de ces PBMC. a) Graphique de densité représentant l'ensemble des cellules analysées (gauche), seulement le SNC (centre) et seulement la rate (droite). b) Localisation de diverses populations sur le graphique t-SNE.

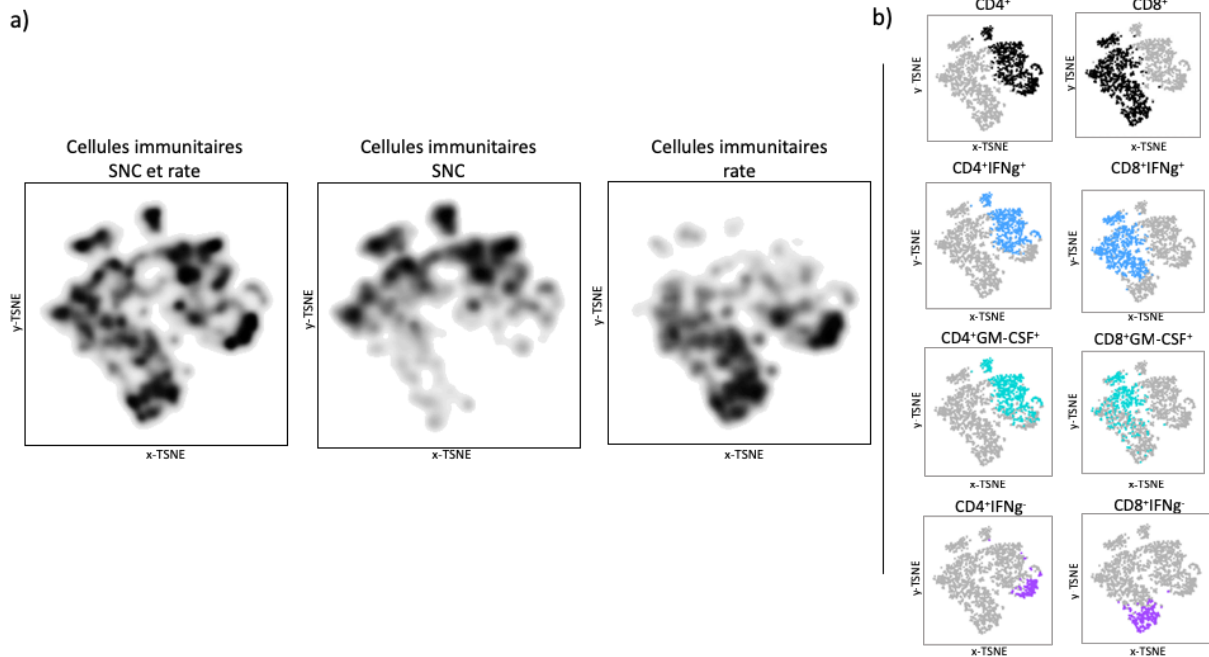


Figure 17. **Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC à j32 (MS-4 et CTRL-3).**

Graphique de l'analyse t-SNE des hCD45 isolés à partir de la rate et du SNC de la souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC MS-4 (n=3) et CTRL-3 (n=4) 32 jours après l'injection intrapéritonéale de ces PBMC. **a)** Graphique de densité représentant l'ensemble des cellules analysées (gauche), seulement le SNC (centre) et seulement la rate (droite). **b)** Localisation de diverses populations sur le graphique t-SNE.

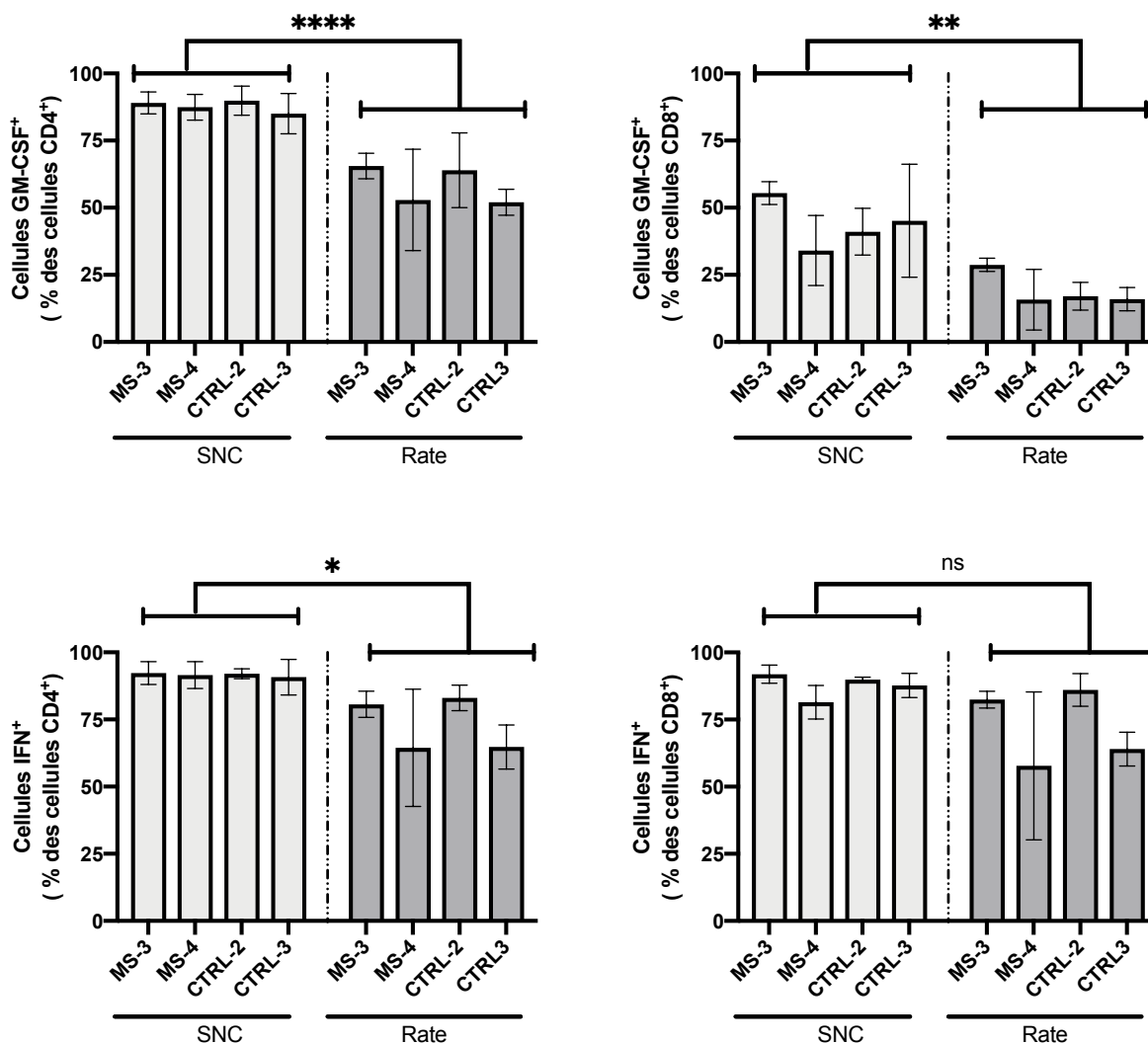


Figure 18. Profil de sécrétion de IFN $\gamma$  et GM-CSF des cellules immunitaires isolées à partir de la rate et du SNC à j25.

Caractérisation du profil de sécrétion de GM-CSF et d'IFN $\gamma$  des cellules immunitaires CD4 et CD8 provenant de la rate et du SNC chez la souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC de sujets atteints de SEP (MS-3; MS-4) ainsi que de sujets sains (CTRL-2; CTRL-3). Cellules isolées du SNC 25 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC. (n=3 pour MS-3; MS-4; CTRL-2 et CTRL-3). Moyenne +/- SEM. Nested t test, ns : non significatif, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\* p<0.0001 .

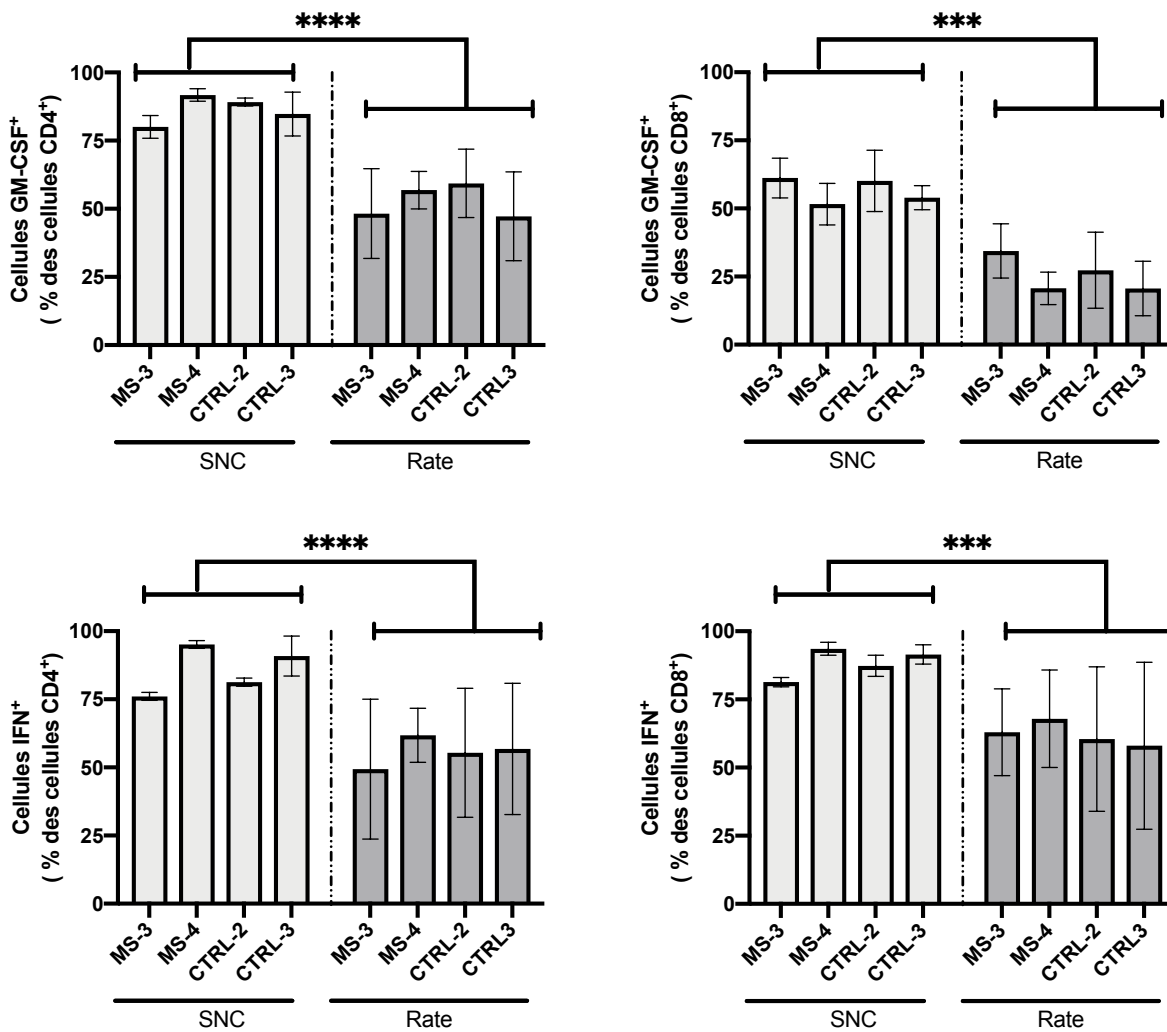


Figure 19. Profil de sécrétion de IFN $\gamma$  et GM-CSF des cellules immunitaires isolées à partir de la rate et du SNC à j32.

Caractérisation du profil de sécrétion de GM-CSF et d'IFN $\gamma$  des cellules immunitaires CD4 et CD8 provenant de la rate et du SNC chez la souris NSG avec reconstitution immunitaire provenant de PBMC de sujets atteints de SEP (MS-3; MS-4) ainsi que de sujets sains (CTRL-2; CTRL-3). Cellules isolées du SNC 32 jours après l'injection intrapéritonéale de PBMC. (n=3 pour MS-3; MS-4; CTRL-2. n=4 pour CTRL-3). Moyenne +/- SEM. Nested t test, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001.



## **Tentative de reconstitution immune chez la souris NSG avec des PBMC de patients pédiatriques avec maladie démyélinisante.**

Comme les expériences précédentes ont démontré que, dans notre modèle, un infiltrat de cellules immunitaires peut être isolé à partir du SNC et que les cellules immunitaires au sein du SNC semblent avoir un profil immunologique distinct de celles retrouvées dans d'autres organes comme la rate, nous avons décidé de répéter nos expériences en modifiant certains paramètres afin d'essayer d'obtenir un modèle de souris humanisée avec maladie démyélinisante.

Nous avons donc, tenté une reconstitution immune chez la souris NSG avec des PBMC décongelés provenant de patients avec maladies démyélinisantes pédiatriques. Pour cette expérience un million de PBMC provenant de patient ayant un ADEM (ADEMped-1) et une SEP (MSped-1), ainsi que deux contrôles ont été injectés par voie intraveineuse chez des souris NSG non irradiées. Un total de 23 souris ont été utilisées pour cette expérience (ADEMped1 n=5; MSped-1 n=5; CTRL-4 n=7; CTRL-5 n=6).

Cliniquement, les souris ont été suivies plus de 100 jours et n'ont démontré aucun symptôme suggérant une atteinte démyélinisante. De plus, nous avons réussi à mettre en évidence des hCD45 circulant seulement pour 3 souris, injectées avec les PBMC provenant de ADEMped, CTRL-4, et CTRL-5. Nous avons donc sacrifié ces souris sans effectuer d'expériences supplémentaires.

## **Discussion**

Nous avons tenté de développer un modèle murin humanisé de SEP chez la souris NSG à partir de PBMC de patients. Ce type de modèle n'existe pas pour le moment et pourrait venir pallier d'importantes limitations qu'ont les modèles expérimentaux actuels. Les souris humanisées offrent l'opportunité unique d'étudier des processus biologiques complexes, sans mettre en danger le patient. En plus, l'avantage d'un tel modèle humanisé serait d'avoir un outil précieux pour développer une médecine personnalisée surtout dans le contexte d'une maladie aussi hétérogène que la SEP.

Nous n'avons pas réussi à développer un tel modèle avec les conditions expérimentales que nous avons mis en place.

## **Reconstitution immunitaire par voie intrapéritonéale après irradiation sublétales**

La reconstitution immune à partir de PBMC injectés par voie intrapéritonéale après irradiation sublétales a eu un excellent taux de réussite dans nos expériences. Ce qui est concordant avec ce qu'on retrouve dans la littérature (M. Ito et al., 2002; M. King et al., 2008). Rapidement après le transfert de PBMC à la souris, nous avons été en mesure d'identifier une proportion satisfaisante de leucocytes humains par rapport au nombre total de leucocytes (humain et murin). La prise de greffe, dans les premières semaines, n'était pas aussi évidente lorsqu'on s'attardait au nombre absolu de leucocytes humains circulant. En effet, ce nombre absolu était plutôt faible les deux premières semaines alors que les leucocytes humains constituaient environ 20% à

40% des leucocytes totaux. Cette observation découle de l'impact probable de l'irradiation qui aurait causé une myéloablation chez l'hôte avec reprise lente de l'hématopoïèse tel qu'il l'a été décrit précédemment (Knibbe-Hollinger et al., 2015). Aussi, les analyses de reconstitution immune mettent en évidence une grande variation entre intra-donneurs, comme le suggère la hauteur des barres d'erreurs sur la figure 1. Ce type de variation a déjà été décrite (M. King et al., 2008) et suggère que la prise de greffe dépend de facteurs appartenant à l'hôte.

## **Échec de l'expression d'un phénotype clinique et immunologique s'apparentant à la SEP**

Une des limitations importantes des modèles de souris humanisées est l'apparition de GVHD, processus immunologique qui prend place lorsque le greffon s'attaque à l'organisme hôte. Chez la souris NSG dont la reconstitution immune est faite à partir de PBMC humain, la GVHD dite xénogénique est un phénomène bien décrit qui cause une infiltration des lymphocytes T humains au niveau de plusieurs organes tels que la peau, le foie, les intestins, les poumons et les reins (R. Ito et al.). Comme ce processus peut prendre place dans n'importe quel tissu de l'hôte, il n'est pas étonnant de retrouver un infiltrat de lymphocytes T humain aussi au niveau cérébral, comme il a été observé précédemment (Kebir et al., 2018).

Dans notre modèle expérimental, nous n'avons pas réussi à reproduire un phénotype clinique et pathologique distinct chez les souris ayant reçu les PBMC de patients atteints de SEP, lorsque comparées à celles ayant reçu les PBMC de sujet

sain; ceci suggérant que l'infiltration cellulaire et l'immunophénotype de ces cellules ne sont que le seul reflet de la GVHD.

Si la supposition qu'il est possible de développer un modèle de SEP chez la souris NSG humanisée est vraie, cela veut dire que dans notre modèle expérimental, tel que présenté ici, les mécanismes liés à la GVHD sont prédominants et les mécanismes liés à l'inflammation et la démyélinisation sont soit masqués soit absents (figure 20a). Ainsi les stratégies qui pourraient être adoptées seraient de tenter de

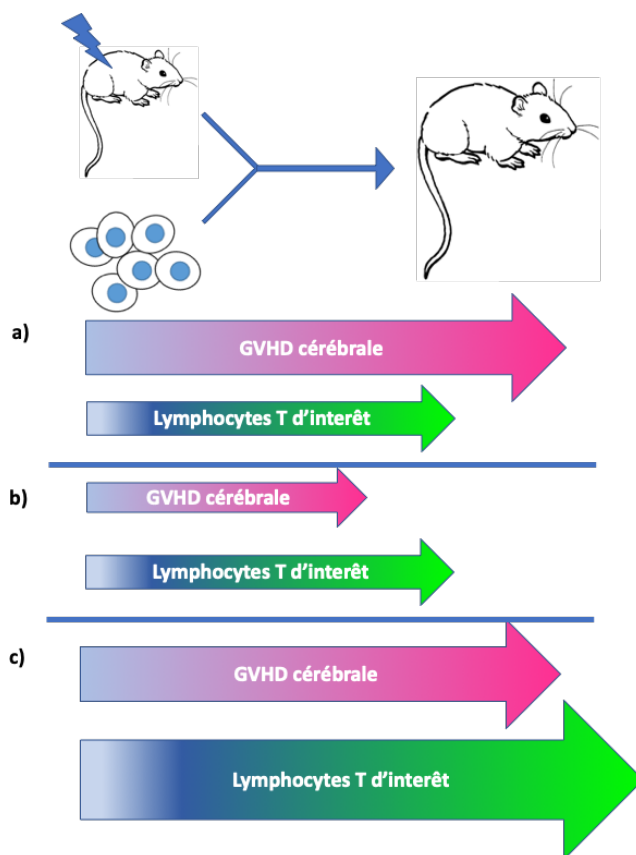


Figure 20. **Représentation schématique des stratégies pouvant être adoptées afin de développer un modèle de souris NSG humanisée de SEP.**

Représentation schématique des stratégies pouvant être adoptées afin de développer un modèle de souris NSG humanisée de SEP. a) Modèle expérimental du projet présenté. b) Atténuation de la GVHD cérébrale pour observer l'apparition de d'autres mécanismes propres au donneur. c) Optimisation de l'expression des mécanismes pathologiques.

diminuer la GVHD cérébrale pour observer si d'autres mécanismes propres au statut du donneur s'installent (figure 20b) ou encore d'optimiser l'expression des mécanismes pathologiques qui mènent à l'inflammation et la démyélinisation au sein du SNC (figure20c).

### **GVHD cérébrale dans notre modèle expérimental**

Il est possible que l'irradiation sublétales ait contribué à favoriser la GVHD cérébrale et a masqué des mécanismes pathologiques dans notre modèle de deux façons.

Premièrement, il est bien connu que l'irradiation est associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE et une altération de sa structure (Y. Q. Li, Chen, Haimovitz-Friedman, Reilly, & Wong, 2003; Liu et al., 2010; Tsao, Li, Lu, Xu, & Wong, 1999). Ainsi, dans notre modèle, bien que l'irradiation ait pour but de faciliter la prise du greffon, elle contribue probablement à perméabiliser la BHE, rendant le SNC plus facilement accessible aux cellules circulantes sans que celles-ci n'aient à enclencher des mécanismes pathologiques leur permettant de traverser la BHE. Or, il est bien connu qu'un des mécanismes pathologiques clef de la SEP est la migration des lymphocytes au travers de la BHE; processus facilité par l'expression de molécules d'adhérence au niveau de la BHE ainsi que l'expression de leurs ligands complémentaires au niveau des cellules immunitaires (Daneman & Prat, 2015). L'irradiation rend donc impossible l'expression de ces mécanismes, qui auraient pu mener à une différence du nombre de cellules immunitaires infiltrant le SNC entre nos

deux groupes. L'absence de différence, montre que l'irradiation a plutôt facilité l'accès des leucocytes circulants pour toutes nos souris, peu importe le donneur.

Deuxièmement, l'irradiation cause des dommages tissulaires importants menant à la libération d'antigènes, à une augmentation de la production des cytokines, à une augmentation de l'expression des CMH, à une augmentation des molécules d'adhésion, à une augmentation de l'expression de facteurs procoagulants et à une augmentation de production d'oxyde nitrique. Ces mécanismes contribuent tous à la facilitation de la GVHD (Ferrara, 1993; Schroeder & DiPersio, 2011; Teshima et al.). Dans notre modèle, il est possible que la radiation cause des dommages tissulaires et libère des antigènes et des facteurs solubles facilitant la présentation d'antigènes par les CPA appartenant au greffon et l'installation de la GVHD. De plus, l'augmentation de l'expression des CMH associée à la radiation contribue aussi probablement à la GVHD puisqu'il a été démontré qu'une interaction entre les lymphocytes T CD4 et les CMH II murins est une composante importante de la GVHD dans les modèles de souris humanisée (Covassin et al., 2011; M. A. King et al., 2009). Enfin, l'irradiation est associée à une accélération de la GVHD chez la souris NSG avec reconstitution immune issues de PBMC humains (Lucas, Shearer, Neudorf, & Gress, 1990).

### **Expression des mécanismes pathologiques qui mènent à l'inflammation et la démyélinisation au sein du SNC**

Notre modèle n'a pas permis de reproduire l'expression des mécanismes pathologiques menant à l'inflammation et à la démyélinisation caractéristiques de la SEP. Pourtant, les PBMC qui ont servi à la reconstitution immune de nos souris, pour

les groupes SEP, contenaient probablement des lymphocytes T autoréactifs dirigés contre des antigènes de la myéline (Kerlero de Rosbo et al., 1993; Lindert et al., 1999; Ota et al., 1990). Pour pouvoir être activés, ces lymphocytes devaient rencontrer leurs antigènes présentés par une CPA humaine. Comme nous n'avons pas observé de démyélinisation chez nos souris, on peut supposer que ces mécanismes d'activation n'ont pas pris place dans notre modèle, ou qu'ils auraient pu se produire plus tard, mais qu'ils ont été masqués par la GVHD.

Nous partageons une importante homologie avec la souris, mais il est possible que l'antigène qui devait être reconnu par les lymphocytes T autoréactifs ne soit pas présent chez nos souris.

L'analyse des PBMC utilisés pour la reconstitution immune de nos souris a démontré la présence de cellules CD11c<sup>+</sup>, ce qui inclut les monocytes, et CD19<sup>+</sup> qui représentent les lymphocytes B. Ces deux sous-types cellulaires peuvent avoir une fonction de présentation d'antigène. Seulement, ils sont pour ainsi dire absents du sang périphérique une fois que la reconstitution a pris place, puisque les lymphocytes T exprimant le CD3 représentent la presque totalité des leucocytes humains circulants. Bien qu'il ne soit pas exclu que ces cellules aient rapidement migrées vers les tissus pour effectuer des fonctions de présentation d'antigènes, on peut se demander si ces sous-types cellulaires ont survécu dans l'hôte étant donné l'absence de cytokines humaines nécessaires à leur survie.

Pour optimiser la présentation d'antigènes dans les modèles de souris humanisées, certaines techniques ont été développées. Premièrement, il est possible

d'effectuer des manipulations génétiques afin que la souris NSG exprime des CMH humains en l'absence de CMH de souris (Goettel et al., 2015), ce qui, en plus de faciliter la présentation d'antigènes, diminue la GVHD. Dans ce contexte, il pourrait être intéressant de développer une souris NSG transgénique qui exprimerait les CMH II humains qui sont reliés à la SEP, tel qu'il l'a été fait pour des souris transgéniques d'EAE spontanées (Ellmerich et al., 2004). Ceci pourrait possiblement favoriser l'activation des lymphocytes T autoréactifs.

Une autre méthode qui a donné d'excellents résultats est celle d'effectuer un transfert, concordant pour le donneur, de cellules dendritiques différenciées à partir de monocytes circulants. La souris acquiert ainsi des CPA humains, ce qui rend possible une interaction lymphocyte T et CPA humain *in vivo* chez la souris. (Lucas et al., 1990; Salguero et al., 2014). Dans l'optique de développer un modèle humanisé de SEP, il pourrait être intéressant d'exposer, en culture, les cellules dendritiques à des antigènes de la myéline avant de les transférer à une souris NSG avec reconstitution immune qui soit concordante pour le donneur. Il a déjà été démontré que chez la souris non humanisée ce genre de procédure provoque une EAE (Salguero et al., 2014).

Il existe encore beaucoup d'inconnus dans la physiopathologie de la SEP et il est possible que d'autres éléments, en dehors de l'activation des lymphocytes T, nuisent au développement de notre modèle. On peut nommer entre autres l'impact de l'irradiation sur la microglie et les conséquences qui en découlent sur le développement de la maladie. Il est généralement accepté que la microglie est un type cellulaire résistant à la radiation, mais des études récentes remettent en doute ce paradigme et ont démontré certaines microglies ne survivent pas à l'irradiation et que celles qui



survivent présentent des altérations qui persistent dans le temps (Menzel et al., 2018). Comme les souris NSG sont sensibles à l'irradiation, il est fort possible que leurs microglies après l'irradiation présente des dommages dont l'impact est difficile à prévoir. Ceci est encore plus important considérant qu'il a déjà été démontré en EAE classique que les manipulations de la microglie peuvent affecter l'expression de la maladie (Heppner et al., 2005).

Enfin, bien que nous n'ayons pu mettre en évidence des différences entre nos groupes par rapport à l'infiltrat de cellules immunitaires au niveau du SNC, nous avons démontré une différence significative dans le profil d'expression de certaines cytokines, GM-CSF et IFN $\gamma$ , des lymphocytes T ayant infiltré le SNC lorsque comparé à ceux de la rate. Ceci prouve que les cellules immunitaires dans le modèle NSG humanisée peuvent acquérir un immunophénotype qui est déterminé par le tissu qu'elles infiltrent, ici le SNC. La souris NSG humanisée a donc un bon potentiel pour modéliser les maladies impliquant le système immunitaire et le SNC, comme peut en témoigner le développement récent d'un modèle d'encéphalite de Rasmussen chez ces souris (Kebir et al., 2018).

## **Tentative d'optimisation du modèle de souris humanisée avec maladie démyélinisante.**

Afin d'optimiser notre modèle, nous avons décidé de changer les conditions expérimentales pour essayer de limiter l'infiltration cellulaire qui était liée à la GVHD et de plutôt favoriser une infiltration cellulaire liée à la pathologie démyélinisante. Pour ce faire nos stratégies étaient de ne pas irradier la souris, de procéder à une injection

intraveineuse des PBMC et d'obtenir des échantillons de patients ayant une maladie plus agressive cliniquement.

Il y a eu un échec de prise de greffe pour les souris qui ont été soumises à ces trois conditions.

L'irradiation avant la reconstitution immune par injection de PBMC chez la souris NSG est utilisée de façon inconstante dans les études et plusieurs auteurs affirment avoir eu de bon taux de reconstitution immune sans avoir eu recours à l'irradiation (Harui, Kiertscher, & Roth, 2011; M. Ito et al., 2002; M. King et al., 2008; Pyo et al., 2019).

Le succès de l'injection par voie intraveineuse chez la souris NSG non irradiée semble plus inconstant (Amadori et al., 1996; Dale L. Greiner, Ruth Ann Hesselton, & Leonard D. Shultz, 1998), mais certains auteurs rapportent des taux de reconstitution immune de 100% (M. King et al., 2008). De plus, la reconstitution immune est achevée plus rapidement avec des niveaux de cellules humaines circulantes plus élevées. Cependant, à la différence du protocole ici appliqué, dans ces études se sont  $20 \times 10^6$  PBMC qui ont été transférés.

## **L'utilisation de l'algorithme t-SNE pour l'analyse de données de cytométrie en flux.**

Au courant des dernières années, la complexité des cymomètres en flux n'a fait que s'accroître, nous permettant maintenant d'acquérir plus de données avec le même échantillon. L'utilisation de stratégie de sélection de population pour l'analyse (*gating strategy*) de ces données devient alors plus ardue en plus d'ajouter un biais, puisque

la sélection des populations étudiées est choisie par le chercheur. L'utilisation de l'algorithme t-SNE pour l'analyse des données de cytométrie en flux est une technique d'analyse non biaisée qui permet parfois d'identifier un sous-groupe cellulaire d'intérêt, qui aurait peut-être échappé à l'analyse par sélection de population (Acuff & Linden, 2017; Mair et al., 2016; Saeys, Van Gassen, & Lambrecht, 2016). Ce type d'analyse était l'analyse de choix pour nos données de cytométrie en flux, puisque nous ne cherchions pas à étudier un phénotype précis, mais bien à identifier l'immunophénotype qui aurait pu permettre de différencier nos deux groupes. Bien que nous n'ayons pas réussi à identifier un tel phénotype dans nos différents groupes de SNC, le fait d'avoir réussi à en identifier un entre nos échantillons provenant du SNC et de la rate démontre que cette analyse est un bon outil pour la cytométrie en flux. Cependant, il faut reconnaître que cet outil a des limites lorsqu'appliqués à la cytométrie en flux, la principale la limite étant la contamination avec fluorescence de fond (*background*) (Mazza et al., 2018).

## Conclusion

En conclusion, le développement d'un modèle de souris humanisée de SEP pourrait venir combler certaines lacunes qu'on les modèles expérimentaux actuels. Par contre, pour développer ce type de modèle, l'optimisation est parfois ardue étant donné qu'il reste encore beaucoup d'inconnu sur les mécanismes qui prennent place entre le greffon et l'hôte.

Bien que nous ayons réussi avec succès à obtenir une reconstitution immune avec les PBMC de patient atteints de SEP transférés chez la souris et qu'un infiltrat de cellules immunitaires au niveau du SNC était présent, nous n'avons pas réussi à obtenir de phénotype clinique ou immunologique suggérant des caractéristiques de SEP. Cependant, l'immunophénotype distinct des cellules que l'on retrouve au niveau du SNC, lorsque comparé à celles retrouvées au sein de la rate nous suggère que la cellule immunitaire acquiert un profil différent en fonction des tissus où elles se trouvent et que la souris NSG humanisée a un bon potentiel pour le développement de modèle de maladie neuroimmunologique.

## Bibliographie

- Acuff, N. V., & Linden, J. (2017). Using Visualization of &lt;em>&lt;/em>-Distributed Stochastic Neighbor Embedding To Identify Immune Cell Subsets in Mouse Tumors. *The Journal of Immunology*, 1602077. doi:10.4049/jimmunol.1602077
- Alonso, A., & Hernan, M. A. (2008). Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*, 71(2), 129-135. doi:10.1212/01.wnl.0000316802.35974.34
- Alters, S. E., Sakai, K., Steinman, L., & Oi, V. T. (1990). Mechanisms of anti-CD4-mediated depletion and immunotherapy. A study using a set of chimeric anti-CD4 antibodies. *The Journal of Immunology*, 144(12), 4587-4592.
- Amadori, A., Veronesi, A., Coppola, V., Indraccolo, S., Mion, M., & Chieco-Bianchi, L. (1996). *The hu-PBL-SCID mouse in human lymphocyte function and lymphomagenesis studies: achievements and caveats*. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Anderson, A. C., Chandwaskar, R., Lee, D. H., Sullivan, J. M., Solomon, A., Rodriguez-Manzanet, R., . . . Kuchroo, V. K. (2012). A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4+ and CD8+ T and B cells. *J Immunol*, 188(5), 2084-2092. doi:10.4049/jimmunol.1102186
- Arellano, G., Ottum, P. A., Reyes, L. I., Burgos, P. I., & Naves, R. (2015). Stage-Specific Role of Interferon-Gamma in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 6(492). doi:10.3389/fimmu.2015.00492
- Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J., & Weiner, H. L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*, 97(4), 742-768. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.021
- Bartholomäus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schläger, C., Miljkovic, D., Ellwart, J. W., . . . Flügel, A. (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*, 462, 94. doi:10.1038/nature08478  
<https://www.nature.com/articles/nature08478#supplementary-information>

- Baxter, A. G., & Cooke, A. (1993). Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, *42*(11), 1574-1578.
- Beecham, A. H., Patsopoulos, N. A., Xifara, D. K., Davis, M. F., Kempainen, A., Cotsapas, C., . . . McCauley, J. L. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*, *45*(11), 1353-1360. doi:10.1038/ng.2770
- Behan, P. O., & Chaudhuri, A. (2014). EAE is not a useful model for demyelinating disease. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *3*(5), 565-574. doi:10.1016/j.msard.2014.06.003
- Ben-Nun, A., Kaushansky, N., Kawakami, N., Krishnamoorthy, G., Berer, K., Liblau, R., . . . Wekerle, H. (2014). From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun*, *54*, 33-50. doi:10.1016/j.jaut.2014.06.004
- Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z. A., Boziki, M., Johner, C., . . . Krishnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, *479*(7374), 538-541. doi:10.1038/nature10554
- Bettelli, E., Baeten, D., Jager, A., Sobel, R. A., & Kuchroo, V. K. (2006). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest*, *116*(9), 2393-2402. doi:10.1172/jci28334
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H. L., Linington, C., Sobel, R. A., & Kuchroo, V. K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*, *197*(9), 1073-1081. doi:10.1084/jem.20021603
- Bever, C. T., Panitch, H. S., Levy, H. B., McFarlin, D. E., & Johnson, K. P. (1991). Gamma-interferon induction in patients with chronic progressive MS. *Neurology*, *41*(7), 1124. doi:10.1212/WNL.41.7.1124
- Billiau, A., & Matthys, P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*, *70*(6), 849-860.

- Blakemore, W. F. (1972). Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol*, *1*(4), 413-426.
- Blakemore, W. F., & Franklin, R. J. (2008). Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol*, *318*, 193-212.
- Booss, J., Esiri, M. M., Tourtellotte, W. W., & Mason, D. Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, *62*(1-3), 219-232.
- Bosma, G. C., Custer, R. P., & Bosma, M. J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, *301*(5900), 527-530.
- Bosma, M. J., & Carroll, A. M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol*, *9*, 323-350. doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.001543
- Brosnan, C. F., Cannella, B., Battistini, L., & Raine, C. S. (1995). Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology*, *45*(6 Suppl 6), S16-21.
- Brostoff, S. W., & Mason, D. W. (1984). Experimental allergic encephalomyelitis: successful treatment in vivo with a monoclonal antibody that recognizes T helper cells. *J Immunol*, *133*(4), 1938-1942.
- Brynedal, B., Duvefelt, K., Jonasdottir, G., Roos, I. M., Åkesson, E., Palmgren, J., & Hillert, J. (2007). HLA-A Confers an HLA-DRB1 Independent Influence on the Risk of Multiple Sclerosis. *PLOS ONE*, *2*(7), e664. doi:10.1371/journal.pone.0000664
- Cao, Y., Goods, B. A., Raddassi, K., Nepom, G. T., Kwok, W. W., Love, J. C., & Hafler, D. A. (2015). Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med*, *7*(287), 287ra274. doi:10.1126/scitranslmed.aaa8038
- Chen, X., Winkler-Pickett, R. T., Carbonetti, N. H., Ortaldo, J. R., Oppenheim, J. J., & Howard, O. M. (2006). Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Eur J Immunol*, *36*(3), 671-680. doi:10.1002/eji.200535353

- Chinwalla, A. T., Cook, L. L., Delehaunty, K. D., Fewell, G. A., Fulton, L. A., Fulton, R. S., . . . Members of the Mouse Genome Analysis, G. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520-562. doi:10.1038/nature01262
- Christianson, S. W., Greiner, D. L., Hesselton, R. A., Leif, J. H., Wagar, E. J., Schweitzer, I. B., . . . Shultz, L. D. (1997). Enhanced human CD4<sup>+</sup> T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J Immunol*, *158*(8), 3578-3586.
- Christianson, S. W., Greiner, D. L., Schweitzer, I. B., Gott, B., Beamer, G. L., Schweitzer, P. A., . . . Shultz, L. D. (1996). Role of natural killer cells on engraftment of human lymphoid cells and on metastasis of human T-lymphoblastoid leukemia cells in C57BL/6J-scid mice and in C57BL/6J-scid bg mice. *Cell Immunol*, *171*(2), 186-199. doi:10.1006/cimm.1996.0193
- Clatch, R. J., Lipton, H. L., & Miller, S. D. (1986). Characterization of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-specific delayed-type hypersensitivity responses in TMEV-induced demyelinating disease: correlation with clinical signs. *J Immunol*, *136*(3), 920-927.
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, *372*(9648), 1502-1517. doi:10.1016/s0140-6736(08)61620-7
- Confavreux, C., & Vukusic, S. (2006). Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*, *129*(Pt 3), 606-616. doi:10.1093/brain/awl007
- Cooke, K. R., Kobzik, L., Martin, T. R., Brewer, J., Delmonte, J., Jr., Crawford, J. M., & Ferrara, J. L. (1996). An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*, *88*(8), 3230-3239.
- Covassin, L., Laning, J., Abdi, R., Langevin, D. L., Phillips, N. E., Shultz, L. D., & Brehm, M. A. (2011). Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2 $\gamma$ null H2-Ab1 tm1Gru Tg (human leucocyte antigen D-related 4) mice: a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease. *Clinical & Experimental Immunology*, *166*(2), 269-280. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04462.x



- Croxford, A. L., Spath, S., & Becher, B. (2015). GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage. *Trends in Immunology*, 36(10), 651-662. doi:<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.004>
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), a020412. doi:10.1101/cshperspect.a020412
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, 15(9), 545-558. doi:10.1038/nri3871
- Dhaeze, T., Lachance, C., Tremblay, L., Grasmuck, C., Bourbonniere, L., Larouche, S., . . . Prat, A. (2019). Sex-dependent factors encoded in the immune compartment dictate relapsing or progressive phenotype in demyelinating disease. *JCI Insight*, 4(6). doi:10.1172/jci.insight.124885
- Ellmerich, S., Takacs, K., Mycko, M., Waldner, H., Wahid, F., Boyton, R. J., . . . Altmann, D. M. (2004). Disease-related epitope spread in a humanized T cell receptor transgenic model of multiple sclerosis. *Eur J Immunol*, 34(7), 1839-1848. doi:10.1002/eji.200324044
- Eriksson, M., Andersen, O., & Runmarker, B. (2003). Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 9(3), 260-274. doi:10.1191/1352458503ms914oa
- Ferrara, J. L. M. (1993). Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Current Opinion in Immunology*, 5(5), 794-799. doi:[https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90139-J](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90139-J)
- Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., & Rocca, M. A. (2018). Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 43. doi:10.1038/s41572-018-0041-4
- Fischer, M. T., Wimmer, I., Hoftberger, R., Gerlach, S., Haider, L., Zrzavy, T., . . . Lassmann, H. (2013). Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain*, 136(Pt 6), 1799-1815. doi:10.1093/brain/awt110
- Flugel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D. E., Li, Z., . . . Wekerle, H. (2001). Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells

- before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, *14*(5), 547-560.
- Franklin, R. J., & Gallo, V. (2014). The translational biology of remyelination: past, present, and future. *Glia*, *62*(11), 1905-1915. doi:10.1002/glia.22622
- Friese, M. A., Jakobsen, K. B., Friis, L., Etzensperger, R., Craner, M. J., McMahon, R. M., . . . Fugger, L. (2008). Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat Med*, *14*(11), 1227-1235. doi:10.1038/nm.1881
- Fulop, G. M., & Phillips, R. A. (1990). The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature*, *347*(6292), 479-482. doi:10.1038/347479a0
- Gerhauser, I., Hansmann, F., Ciurkiewicz, M., Loscher, W., & Beineke, A. (2019). Facets of Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus-Induced Diseases: An Update. *Int J Mol Sci*, *20*(2). doi:10.3390/ijms20020448
- Ghareghani, M., Reiter, R. J., Zibara, K., & Farhadi, N. (2018). Latitude, Vitamin D, Melatonin, and Gut Microbiota Act in Concert to Initiate Multiple Sclerosis: A New Mechanistic Pathway. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2484.
- Goettel, J. A., Biswas, S., Lexmond, W. S., Yeste, A., Passerini, L., Patel, B., . . . Snapper, S. B. (2015). Fatal autoimmunity in mice reconstituted with human hematopoietic stem cells encoding defective FOXP3. *Blood*, *125*(25), 3886-3895. doi:10.1182/blood-2014-12-618363
- Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L. P., Hood, L., & Zaller, D. M. (1993). Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*, *72*(4), 551-560.
- Goverman, J. M. (2011). Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunological reviews*, *241*(1), 228-240. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01016.x
- Gregersen, J. W., Holmes, S., & Fugger, L. (2004). Humanized animal models for autoimmune diseases. *Tissue Antigens*, *63*(5), 383-394. doi:10.1111/j.0001-2815.2004.00243.x
- Greiner, D. L., Hesselton, R. A., & Shultz, L. D. (1998). SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells*, *16*(3), 166-177. doi:10.1002/stem.160166

- Greiner, D. L., Hesselton, R. A., & Shultz, L. D. (1998). SCID Mouse Models of Human Stem Cell Engraftment. *Stem Cells*, *16*(3), 166-177. doi:10.1002/stem.160166
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci*, *8*, 73. doi:10.3389/fncel.2014.00073
- Haley, S. A., & Atwood, W. J. (2017). Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Endemic Viruses and Lethal Brain Disease. *Annu Rev Virol*, *4*(1), 349-367. doi:10.1146/annurev-virology-101416-041439
- Hall, S. M. (1972). The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *J Cell Sci*, *10*(2), 535-546.
- Harkioliaki, M., Holmes, S. L., Svendsen, P., Gregersen, J. W., Jensen, L. T., McMahon, R., . . . Fugger, L. (2009). T Cell-Mediated Autoimmune Disease Due to Low-Affinity Crossreactivity to Common Microbial Peptides. *Immunity*, *30*(3), 348-357. doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.009>
- Hartmann, F. J., Khademi, M., Aram, J., Ammann, S., Kockum, I., Constantinescu, C., . . . Becher, B. (2014). Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nature communications*, *5*, 5056. doi:10.1038/ncomms6056  
<https://www.nature.com/articles/ncomms6056#supplementary-information>
- Harui, A., Kiertscher, S. M., & Roth, M. D. (2011). Reconstitution of huPBL-NSG mice with donor-matched dendritic cells enables antigen-specific T-cell activation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, *6*(1), 148-157. doi:10.1007/s11481-010-9223-x
- Hauser, S. L., Bar-Or, A., Comi, G., Giovannoni, G., Hartung, H. P., Hemmer, B., . . . Kappos, L. (2017). Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, *376*(3), 221-234. doi:10.1056/NEJMoa1601277
- Hedstrom, A. K., Baarnhielm, M., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2009). Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology*, *73*(9), 696-701. doi:10.1212/WNL.0b013e3181b59c40
- Hedström, A. K., Lima Bomfim, I., Barcellos, L., Gianfrancesco, M., Schaefer, C., Kockum, I., . . . Alfredsson, L. (2014). Interaction between adolescent obesity and HLA risk

- genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology*, 82(10), 865-872. doi:10.1212/WNL.0000000000000203
- Heppner, F. L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hovelmeyer, N., . . . Aguzzi, A. (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med*, 11(2), 146-152. doi:10.1038/nm1177
- Herbert, W. J. (1968). The mode of action of mineral-oil emulsion adjuvants on antibody production in mice. *Immunology*, 14(3), 301-318.
- Heremans, H., Dillen, C., Groenen, M., Martens, E., & Billiau, A. (1996). Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. *Eur J Immunol*, 26(10), 2393-2398. doi:10.1002/eji.1830261019
- Hernan, M. A., Jick, S. S., Logroscino, G., Olek, M. J., Ascherio, A., & Jick, H. (2005). Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain*, 128(Pt 6), 1461-1465. doi:10.1093/brain/awh471
- Hesselton, R. M., Greiner, D. L., Mordes, J. P., Rajan, T. V., Sullivan, J. L., & Shultz, L. D. (1995). High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. *J Infect Dis*, 172(4), 974-982.
- Hicks, D. J., Fooks, A. R., & Johnson, N. (2012). Developments in rabies vaccines. *Clinical and experimental immunology*, 169(3), 199-204. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04592.x
- Hofstetter, H. H., Ibrahim, S. M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K. V., & Gold, R. (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*, 237(2), 123-130. doi:10.1016/j.cellimm.2005.11.002
- Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C., & Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med*, 194(5), 669-676.
- Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., Yoshimoto, G., . . . Harada, M. (2005). Development of functional human blood and immune systems in

- NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood*, *106*(5), 1565-1573. doi:10.1182/blood-2005-02-0516
- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., . . . Nakahata, T. (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, *100*(9), 3175-3182. doi:10.1182/blood-2001-12-0207
- Ito, R., Katano I Fau - Kawai, K., Kawai K Fau - Hirata, H., Hirata H Fau - Ogura, T., Ogura T Fau - Kamisako, T., Kamisako T Fau - Eto, T., . . . Ito, M. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. (1534-6080 (Electronic)).
- Jeffery, N. D., & Blakemore, W. F. (1995). Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J Neurocytol*, *24*(10), 775-781.
- Ji, Q., Perchellet, A., & Goverman, J. M. (2010). Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol*, *11*(7), 628-634. doi:10.1038/ni.1888
- Kaltsonoudis, E., Voulgari, P. V., Konitsiotis, S., & Drosos, A. A. (2014). Demyelination and other neurological adverse events after anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev*, *13*(1), 54-58. doi:10.1016/j.autrev.2013.09.002
- Kamradt, T., Soloway, P. D., Perkins, D. L., & Geffer, M. L. (1991). Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *The Journal of Immunology*, *147*(10), 3296.
- Kataoka, S., Satoh, J., Fujiya, H., Toyota, T., Suzuki, R., Itoh, K., & Kumagai, K. (1983). Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes*, *32*(3), 247-253.
- Kawakami, N., Nagerl, U. V., Odoardi, F., Bonhoeffer, T., Wekerle, H., & Flugel, A. (2005). Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med*, *201*(11), 1805-1814. doi:10.1084/jem.20050011
- Kebir, H., Carmant, L., Fontaine, F., Beland, K., Bosoi, C. M., Sanon, N. T., . . . Haddad, E. (2018). Humanized mouse model of Rasmussen's encephalitis supports the

- immune-mediated hypothesis. *J Clin Invest*, 128(5), 2000-2009. doi:10.1172/jci97098
- Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J. I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., . . . Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 66(3), 390-402. doi:10.1002/ana.21748
- Kemanetzoglou, E., & Andreadou, E. (2017). CNS Demyelination with TNF-alpha Blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17(4), 36. doi:10.1007/s11910-017-0742-1
- Kenyon, L. C., Biswas, K., Shindler, K. S., Nabar, M., Stout, M., Hingley, S. T., . . . Das Sarma, J. (2015). Gliopathy of Demyelinating and Non-Demyelinating Strains of Mouse Hepatitis Virus. *Front Cell Neurosci*, 9, 488. doi:10.3389/fncel.2015.00488
- Kerlero de Rosbo, N., Milo, R., Lees, M. B., Burger, D., Bernard, C. C., & Ben-Nun, A. (1993). Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest*, 92(6), 2602-2608. doi:10.1172/jci116875
- Kesterson, J. W., & Carlton, W. W. (1972). Cuprizone toxicosis in mice--attempts to antidote the toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 22(1), 6-13.
- King, M., Pearson, T., Shultz, L. D., Leif, J., Bottino, R., Trucco, M., . . . Greiner, D. L. (2008). A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clinical Immunology*, 126(3), 303-314. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.11.001>
- King, M. A., Covassin, L., Brehm, M. A., Racki, W., Pearson, T., Leif, J., . . . Greiner, D. L. (2009). Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clinical & Experimental Immunology*, 157(1), 104-118. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03933.x
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathology*, 27(2), 123-137. doi:10.1111/bpa.12454

- Kirk, J., Plumb, J., Mirakhur, M., & McQuaid, S. (2003). Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood–brain barrier leakage and active demyelination. *The Journal of Pathology*, *201*(2), 319-327. doi:10.1002/path.1434
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., & Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol*, *9*(12), 833-844. doi:10.1038/nri2669
- Kleiveland, C. R. (2015). Peripheral Blood Mononuclear Cells. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (pp. 161-167). Cham: Springer International Publishing.
- Knibbe-Hollinger, J. S., Fields, N. R., Chaudoin, T. R., Epstein, A. A., Makarov, E., Akhter, S. P., . . . Poluektova, L. Y. (2015). Influence of age, irradiation and humanization on NSG mouse phenotypes. *Biology open*, *4*(10), 1243-1252. doi:10.1242/bio.013201
- Kobelt, G., Thompson, A., Berg, J., Gannedahl, M., & Eriksson, J. (2017). New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Multiple Sclerosis Journal*, *23*(8), 1123-1136. doi:10.1177/1352458517694432
- Krishnamoorthy, G., Lassmann, H., Wekerle, H., & Holz, A. (2006). Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest*, *116*(9), 2385-2392. doi:10.1172/jci28330
- Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Bruck, W., & Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*, *133*(1), 13-24. doi:10.1007/s00401-016-1653-y
- Kurland, L. T. (1952). Epidemiologic characteristics of multiple sclerosis. *The American Journal of Medicine*, *12*(5), 561-571. doi:[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(52\)90236-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(52)90236-2)
- Kutzelnigg, A., Stadelmann, C., Lucchinetti, C. F., Lassmann, H., Rauschka, H., Parisi, J. E., . . . Brück, W. (2005). Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, *128*(11), 2705-2712. doi:10.1093/brain/awh641

- Kuypers, N. J., James, K. T., Enzmann, G. U., Magnuson, D. S., & Whittemore, S. R. (2013). Functional consequences of ethidium bromide demyelination of the mouse ventral spinal cord. *Exp Neurol*, *247*, 615-622. doi:10.1016/j.expneurol.2013.02.014
- Lafaille, J. J., Nagashima, K., Katsuki, M., & Tonegawa, S. (1994). High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*, *78*(3), 399-408.
- Lapidot, T. (2001). Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci*, *938*, 83-95.
- Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D. E., & Dick, J. E. (1992). Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science*, *255*(5048), 1137-1141.
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, *133*(2), 223-244. doi:10.1007/s00401-016-1631-4
- Lassmann, H., Bruck, W., & Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*, *17*(2), 210-218. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x
- Li, R., Patterson, K. R., & Bar-Or, A. (2018). Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol*, *19*(7), 696-707. doi:10.1038/s41590-018-0135-x
- Li, Y. Q., Chen, P., Haimovitz-Friedman, A., Reilly, R. M., & Wong, C. S. (2003). Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res*, *63*(18), 5950-5956.
- Lieber, M. R., Hesse, J. E., Lewis, S., Bosma, G. C., Rosenberg, N., Mizuuchi, K., . . . Gellert, M. (1988). The defect in murine severe combined immune deficiency: joining of signal sequences but not coding segments in V(D)J recombination. *Cell*, *55*(1), 7-16.
- Lincoln, M. R., Montpetit, A., Cader, M. Z., Saarela, J., Dymont, D. A., Tiislar, M., . . . Hudson, T. J. (2005). A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nature Genetics*, *37*, 1108. doi:10.1038/ng1647



<https://www.nature.com/articles/ng1647#supplementary-information>

- Lindert, R. B., Haase, C. G., Brehm, U., Linington, C., Wekerle, H., & Hohlfeld, R. (1999). Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain*, *122* ( Pt 11), 2089-2100.
- Linthicum, D. S., & Frelinger, J. A. (1982). Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes. *The Journal of experimental medicine*, *156*(1), 31. doi:10.1084/jem.156.1.31
- Liu, Y., Xiao, S., Liu, J., Zhou, H., Liu, Z., Xin, Y., & Suo, W. Z. (2010). An Experimental Study of Acute Radiation-Induced Cognitive Dysfunction in a Young Rat Model. *American Journal of Neuroradiology*, *31*(2), 383. doi:10.3174/ajnr.A1801
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., . . . Steinman, L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine*, *8*, 500. doi:10.1038/nm0502-500

<https://www.nature.com/articles/nm0502-500#supplementary-information>

- Lovato, L., Willis, S. N., Rodig, S. J., Caron, T., Almendinger, S. E., Howell, O. W., . . . Hafler, D. A. (2011). Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain*, *134*(Pt 2), 534-541. doi:10.1093/brain/awq350
- Lowry, P. A., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Hesselton, R. M., Kittler, E. L., Tiarks, C. Y., . . . Quesenberry, P. J. (1996). Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*, *2*(1), 15-23.
- Lu, C., Pelech, S., Zhang, H., Bond, J., Spach, K., Noubade, R., . . . Teuscher, C. (2008). Pertussis toxin induces angiogenesis in brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Res*, *86*(12), 2624-2640. doi:10.1002/jnr.21716
- Lucas, P., Shearer, G., Neudorf, S., & Gress, R. (1990). The human antimurine xenogeneic cytotoxic response. I. Dependence on responder antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology*, *144*(12), 4548-4554.

- Lutterotti, A. (2018). Challenges and needs in experimental therapies for multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 31(3), 263-267. doi:10.1097/wco.0000000000000560
- Madsen, L. S., Andersson, E. C., Jansson, L., krogsgaard, M., Andersen, C. B., Engberg, J., . . . Fugger, L. (1999). A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet*, 23(3), 343-347. doi:10.1038/15525
- Maimone, D., Gregory, S., Arnason, B. G., & Reder, A. T. (1991). Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 32(1), 67-74.
- Mair, F., Hartmann, F. J., Mrdjen, D., Tosevski, V., Krieg, C., & Becher, B. (2016). The end of gating? An introduction to automated analysis of high dimensional cytometry data. *European Journal of Immunology*, 46(1), 34-43. doi:10.1002/eji.201545774
- Malynn, B. A., Blackwell, T. K., Fulop, G. M., Rathbun, G. A., Furley, A. J., Ferrier, P., . . . Alt, F. W. (1988). The scid defect affects the final step of the immunoglobulin VDJ recombinase mechanism. *Cell*, 54(4), 453-460.
- Martin, R., Sospedra, M., Rosito, M., & Engelhardt, B. (2016). Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *European Journal of Immunology*, 46(9), 2078-2090. doi:10.1002/eji.201646485
- Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Özenci, V., Fredrikson, S., & Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 5(2), 101-104. doi:10.1177/135245859900500206
- Mazza, E. M. C., Brummelman, J., Alvisi, G., Roberto, A., De Paoli, F., Zanon, V., . . . Lugli, E. (2018). Background fluorescence and spreading error are major contributors of variability in high-dimensional flow cytometry data visualization by t-distributed stochastic neighboring embedding. *Cytometry Part A*, 93(8), 785-792. doi:10.1002/cyto.a.23566
- McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M., & Weissman, I. L. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, 241(4873), 1632-1639.

- McIntosh, B. E., & Brown, M. E. (2015). No irradiation required: The future of humanized immune system modeling in murine hosts. *Chimerism*, 6(1-2), 40-45. doi:10.1080/19381956.2016.1162360
- McMahon, E. J., Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H., & Miller, S. D. (2005). Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 11, 335. doi:10.1038/nm1202  
<https://www.nature.com/articles/nm1202#supplementary-information>
- McQualter, J. L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T. W., Hamilton, J. A., . . . Bernard, C. C. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med*, 194(7), 873-882.
- Mecha, M., Carrillo-Salinas, F. J., Mestre, L., Feliu, A., & Guaza, C. (2013). Viral models of multiple sclerosis: neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus. *Prog Neurobiol*, 101-102, 46-64. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.11.003
- Menzel, F., Kaiser, N., Haehnel, S., Rapp, F., Patties, I., Schöneberg, N., . . . Bechmann, I. (2018). Impact of X-irradiation on microglia. *Glia*, 66(1), 15-33. doi:10.1002/glia.23239
- Merrill, J. E., Kono, D. H., Clayton, J., Ando, D. G., Hinton, D. R., & Hofman, F. M. (1992). Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(2), 574-578.
- Miller, S. D., & Karpus, W. J. (2007). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Current Protocols in Immunology*, 77(1), 15.11.11-15.11.18. doi:10.1002/0471142735.im1501s77
- Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M. S., Patarroyo, J. C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., . . . Zamvil, S. S. (2013). MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med*, 210(13), 2921-2937. doi:10.1084/jem.20130699
- Mombaerts, P. (1995). Lymphocyte development and function in T-cell receptor and RAG-1 mutant mice. *Int Rev Immunol*, 13(1), 43-63.

- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., & Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, *68*(5), 869-877.
- Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M., & Wilson, D. B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*, *335*(6187), 256-259. doi:10.1038/335256a0
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*, *296*(23), 2832-2838. doi:10.1001/jama.296.23.2832
- Munoz, J. J., Bernard, C. C. A., & Mackay, I. R. (1984). Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. *Cellular Immunology*, *83*(1), 92-100. doi:[https://doi.org/10.1016/0008-8749\(84\)90228-4](https://doi.org/10.1016/0008-8749(84)90228-4)
- O'Gorman, C., Lin, R., Stankovich, J., & Broadley, S. A. (2013). Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*, *40*(1), 1-12. doi:10.1159/000341902
- Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L. (2017). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, *13*(1), 25-36. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
- Orton, S. M., Herrera, B. M., Yee, I. M., Valdar, W., Ramagopalan, S. V., Sadovnick, A. D., & Ebers, G. C. (2006). Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*, *5*(11), 932-936. doi:10.1016/s1474-4422(06)70581-6
- Ota, K., Matsui, M., Milford, E. L., Mackin, G. A., Weiner, H. L., & Hafler, D. A. (1990). T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature*, *346*(6280), 183-187. doi:10.1038/346183a0
- Owens, G. P., Ritchie, A. M., Burgoon, M. P., Williamson, R. A., Corboy, J. R., & Gilden, D. H. (2003). Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol*, *171*(5), 2725-2733.
- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Haley, A. S., & Johnson, K. P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet*, *1*(8538), 893-895.

- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Schindler, J., & Johnson, K. P. (1987). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology*, *37*(7), 1097-1102.
- Pattison, I. H., & Jebbett, J. N. (1971). Clinical and histological observations on cuprizone toxicity and scrapie in mice. *Res Vet Sci*, *12*(4), 378-380.
- Pavelko, K. D., van Engelen, B. G., & Rodriguez, M. (1998). Acceleration in the rate of CNS remyelination in lysolecithin-induced demyelination. *J Neurosci*, *18*(7), 2498-2505.
- Pearson, T., Markees, T. G., Serreze, D. V., Pierce, M. A., Marron, M. P., Wicker, L. S., . . . Greiner, D. L. (2003). Genetic disassociation of autoimmunity and resistance to costimulation blockade-induced transplantation tolerance in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, *171*(1), 185-195.
- Pflumio, F., Izac, B., Katz, A., Shultz, L. D., Vainchenker, W., & Coulombel, L. (1996). Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood*, *88*(10), 3731-3740.
- Plemel, J. R., Liu, W. Q., & Yong, V. W. (2017). Remyelination therapies: a new direction and challenge in multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*, *16*(9), 617-634. doi:10.1038/nrd.2017.115
- Pöllinger, B., Krishnamoorthy, G., Berer, K., Lassmann, H., Bösl, M. R., Dunn, R., . . . Wekerle, H. (2009). Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *The Journal of experimental medicine*, *206*(6), 1303-1316. doi:10.1084/jem.20090299
- Popescu, B. F., & Lucchinetti, C. F. (2012). Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol*, *7*, 185-217. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132443
- Popescu, B. F. G., Pirko, I., & Lucchinetti, C. F. (2013). Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, *19*(4 Multiple Sclerosis), 901-921. doi:10.1212/01.CON.0000433291.23091.65

- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., & Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*, *47*, 485-505. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.10.004
- Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol*, *759*, 182-191. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.042
- Pyo, K. H., Kim, J. H., Lee, J.-M., Kim, S. E., Cho, J. S., Lim, S. M., & Cho, B. C. (2019). Promising preclinical platform for evaluation of immuno-oncology drugs using Hu-PBL-NSG lung cancer models. *Lung Cancer*, *127*, 112-121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.11.035>
- Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, *12*, 623. doi:10.1038/nri3265
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, *27*, 119-145. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132528
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., . . . Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*, *10*, 514. doi:10.1038/ni.1716  
<https://www.nature.com/articles/ni.1716#supplementary-information>
- Renno, T., Krakowski, M., Piccirillo, C., Lin, J. Y., & Owens, T. (1995). TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol*, *154*(2), 944-953.
- Riise, T., Nortvedt, M. W., & Ascherio, A. (2003). Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology*, *61*(8), 1122-1124.
- Rubino, S. J., Mayo, L., Wimmer, I., Siedler, V., Brunner, F., Hametner, S., . . . Weiner, H. L. (2018). Acute microglia ablation induces neurodegeneration in the

- somatosensory system. *Nature communications*, 9(1), 4578-4578. doi:10.1038/s41467-018-05929-4
- Ruddle, N. H., Bergman, C. M., McGrath, K. M., Lingenheld, E. G., Grunnet, M. L., Padula, S. J., & Clark, R. B. (1990). An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med*, 172(4), 1193-1200. doi:10.1084/jem.172.4.1193
- Sadovnick, A. D., Armstrong, H., Rice, G. P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D. W., . . . et al. (1993). A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol*, 33(3), 281-285. doi:10.1002/ana.410330309
- Saeyns, Y., Van Gassen, S., & Lambrecht, B. N. (2016). Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nature Reviews Immunology*, 16, 449. doi:10.1038/nri.2016.56
- Salguero, G., Daenthanasanmak, A., Münz, C., Raykova, A., Guzmán, C. A., Riese, P., . . . Stripecke, R. (2014). Dendritic Cell-Mediated Immune Humanization of Mice: Implications for Allogeneic and Xenogeneic Stem Cell Transplantation. *The Journal of Immunology*, 192(10), 4636. doi:10.4049/jimmunol.1302887
- Salzer, J., Svenningsson, R., Alping, P., Novakova, L., Björck, A., Fink, K., . . . Svenningsson, A. (2016). Rituximab in multiple sclerosis: A retrospective observational study on safety and efficacy. *Neurology*, 87(20), 2074-2081. doi:10.1212/wnl.0000000000003331
- Sasaki, K., Bean, A., Shah, S., Schutten, E., Huseby, P. G., Peters, B., . . . Huseby, E. S. (2014). Relapsing-remitting central nervous system autoimmunity mediated by GFAP-specific CD8 T cells. *J Immunol*, 192(7), 3029-3042. doi:10.4049/jimmunol.1302911
- Saxena, A., Bauer, J., Scheikl, T., Zappulla, J., Audebert, M., Desbois, S., . . . Mars, L. T. (2008). Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J Immunol*, 181(3), 1617-1621.
- Schroeder, M. A., & DiPersio, J. F. (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Disease Models & Mechanisms*, 4(3), 318. doi:10.1242/dmm.006668

- Serreze, D. V., Gaedeke, J. W., & Leiter, E. H. (1993). Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(20), 9625-9629.
- Sharief, M. K., & Hentges, R. (1991). Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med*, *325*(7), 467-472. doi:10.1056/nejm199108153250704
- Shiina, T., Blancher, A., Inoko, H., & Kulski, J. K. (2017). Comparative genomics of the human, macaque and mouse major histocompatibility complex. *Immunology*, *150*(2), 127-138. doi:10.1111/imm.12624
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., . . . et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, *68*(5), 855-867.
- Shiraki, H., & Uchimura, I. (1957). A Contribution to the Classification and the Pathogenesis of Demyelinating Encephalomyelitis: With Special Reference to the Central Nervous System Lesions Caused by Preventive Inoculation Against Rabies\*†‡. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *16*(2), 139-208. doi:10.1097/00005072-195704000-00001
- Shishido-Hara, Y. (2015). Progressive multifocal leukoencephalopathy: Dot-shaped inclusions and virus-host interactions. *Neuropathology*, *35*(5), 487-496. doi:10.1111/neup.12203
- Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, J. V., & Greiner, D. L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol*, *12*(11), 786-798. doi:10.1038/nri3311
- Shultz, L. D., Ishikawa, F., & Greiner, D. L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*, *7*(2), 118-130. doi:10.1038/nri2017
- Shultz, L. D., Lang, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Lyons, B., Umeda, S., . . . Greiner, D. L. (2000). NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells. *J Immunol*, *164*(5), 2496-2507.



- Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., . . . Handgretinger, R. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*, *174*(10), 6477-6489.
- Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Schweitzer, I. B., Tennent, B., . . . et al. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*, *154*(1), 180-191.
- Sospedra, M., & Martin, R. (2006). Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, *39*(1), 3-8. doi:10.1080/08916930500484922
- Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006a). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, *1*, 1810. doi:10.1038/nprot.2006.285
- Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006b). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, *1*, 1952. doi:10.1038/nprot.2006.284
- Stuart, G., & Krikorian, K. S. (1928). The Neuro-Paralytic Accidents of Anti-Rabies Treatment. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *22*(3), 327-377. doi:10.1080/00034983.1928.11684582
- Stüve, O., Marra, C. M., Bar-Or, A., Niino, M., Cravens, P. D., Cepok, S., . . . Racke, M. K. (2006). Altered CD4+/CD8+ T-Cell Ratios in Cerebrospinal Fluid of Natalizumab-Treated Patients With Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*, *63*(10), 1383-1387. doi:10.1001/archneur.63.10.1383
- Teshima, T., Ordemann R Fau - Reddy, P., Reddy P Fau - Gagin, S., Gagin S Fau - Liu, C., Liu C Fau - Cooke, K. R., Cooke Kr Fau - Ferrara, J. L. M., & Ferrara, J. L. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. (1078-8956 (Print)).
- Thacker, E. L., Mirzaei, F., & Ascherio, A. (2006). Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*, *59*(3), 499-503. doi:10.1002/ana.20820
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., . . . Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*, *17*(2), 162-173. doi:10.1016/s1474-4422(17)30470-2

- TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. (1999). *Neurology*, 53(3), 457-465.
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J. C., Lanzavecchia, A., & Manz, M. G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science*, 304(5667), 104-107. doi:10.1126/science.1093933
- Tsao, M. N., Li, Y. Q., Lu, G., Xu, Y., & Wong, C. S. (1999). Upregulation of vascular endothelial growth factor is associated with radiation-induced blood-spinal cord barrier breakdown. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(10), 1051-1060.
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M., & Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*, 172(1), 146-155. doi:10.2353/ajpath.2008.070690
- van Oosten, B. W., Barkhof, F., Truyen, L., Boringa, J. B., Bertelsmann, F. W., von Blomberg, B. M., . . . Polman, C. H. (1996). Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*, 47(6), 1531-1534.
- Voorthuis, J. A., Uitdehaag, B. M., De Groot, C. J., Goede, P. H., van der Meide, P. H., & Dijkstra, C. D. (1990). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clin Exp Immunol*, 81(2), 183-188.
- Waldner, H., Collins, M., & Kuchroo, V. K. (2004). Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest*, 113(7), 990-997. doi:10.1172/JCI19388
- Waldner, H., Whitters, M. J., Sobel, R. A., Collins, M., & Kuchroo, V. K. (2000). Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3412-3417.
- Walsh, N. C., Kenney, L. L., Jangalwe, S., Aryee, K. E., Greiner, D. L., Brehm, M. A., & Shultz, L. D. Humanized Mouse Models of Clinical Disease. (1553-4014 (Electronic)).

- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., & Linington, C. (1994). Animal models. *Ann Neurol*, 36(S1), S47-S53. doi:10.1002/ana.410360714
- Wheeler, R. D., Zehntner, S. P., Kelly, L. M., Bourbonniere, L., & Owens, T. (2006). Elevated interferon gamma expression in the central nervous system of tumour necrosis factor receptor 1-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*, 118(4), 527-538. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02395.x
- Woodruff, R. H., & Franklin, R. J. (1999). Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: a comparative study. *Glia*, 25(3), 216-228.
- Zamvil, S. S., & Steinman, L. (1990). The T Lymphocyte in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol*, 8(1), 579-621. doi:10.1146/annurev.iy.08.040190.003051
- Zschaler, J., Schlorke, D., & Arnhold, J. Differences in innate immune response between man and mouse. (1040-8401 (Print)).

