



Université de Montréal

**Caractérisation neuro-immunitaire d'un modèle  
d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale spontanée**

par  
Olivia Saint-Laurent

Département de physiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Sciences neurologiques

Août, 2013

© Olivia Saint-Laurent, 2013



## Résumé

La sclérose en plaques est une maladie neuroinflammatoire idiopathique caractérisée par la formation de lésions focales de démyélinisation, qui apparaissent suite à l'infiltration périvasculaire de cellules immunitaires et à l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est le modèle animal de cette maladie. Cependant, ce modèle présente des différences importantes avec la sclérose en plaques.

L'objectif de ce projet de maîtrise était d'approfondir la caractérisation d'un nouveau modèle transgénique d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale spontanée, le modèle TCR1640, afin de valider celui-ci pour l'étude des phénomènes physiopathologiques qui surviennent à différents stades de la sclérose en plaques, ainsi que pour le développement de nouveaux traitements de la maladie. La souris TCR1640 porte un récepteur des cellules T (TCR) transgénique autoréactif, qui reconnaît un peptide de la myéline et déclenche une réaction auto-immune contre la myéline endogène au sein du système nerveux central (SNC).

Des observations faites *in situ* et *in vitro* ont permis d'identifier des changements qui surviennent de façon très précoce dans l'unité neurovasculaire chez les animaux TCR1640 présymptomatiques, et qui sont liés à la présence d'un profil immunitaire périphérique proinflammatoire. Lors des phases actives de l'EAE spontanée, les animaux TCR1640 au stade chronique présentent une inflammation accrue du système nerveux central associée à une infiltration leucocytaire massive, par rapport aux animaux au stade aigu de la maladie.

Une étude *in vivo* a également permis de moduler la maladie développée par des animaux ayant subi une immunisation passive avec des cellules T auxiliaires en provenance de souris TCR1640. Enfin, l'implication de nouvelles molécules d'adhésion cellulaire dans le développement et le maintien de l'EAE spontanée a été suggérée par des observations *in vitro*.

L'ensemble de ces résultats suggère que le modèle TCR1640 présente plusieurs avantages pour l'étude de la physiopathologie de maladies neuroinflammatoires telles que la sclérose en plaques, et servira d'outil afin de valider de nouvelles stratégies thérapeutiques.

**Mots-clés** : Barrière hémato-encéphalique (BHE), système nerveux central (SNC), neuroinflammation, unité neurovasculaire, sclérose en plaques (SEP), encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), molécules d'adhésion cellulaire (CAM).

## Abstract

Multiple sclerosis is an idiopathic inflammatory disease of the central nervous system. It is characterized by the formation of focal perivascular lesions and demyelination of the surrounding area, which appear concomitantly to a massive immune cell infiltration and disruption of the blood brain barrier. Experimental autoimmune encephalomyelitis is the animal model most extensively used for the study of multiple sclerosis. Unfortunately, this model does not mimic many aspects of the human disease.

The goal of this project is to further the characterization of a new transgenic model of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis, the TCR1640 model, and to validate it as a relevant tool for the study of multiple sclerosis physiopathology and treatment. The TCR1640 mouse possesses a transgenic T cell receptor which recognizes a myelin peptide and triggers an autoimmune response against endogenous myelin in the central nervous system.

*In situ* and *in vitro* observations have led to the identification of early changes which appear at the neurovascular unit in presymptomatic TCR1640 animals. This early disruption of blood brain barrier homeostasis is linked to the establishment of a proinflammatory immune profile in the periphery. Animals at the chronic stage show sustained inflammation of the central nervous system parenchyma and massive leukocyte infiltration, compared to animals in acute phase of disease.

An *in vivo* experiment has allowed modulating the disease by treatment with a multiple sclerosis-approved therapy, in wild type mice which had received reactivated CD4<sup>+</sup> T cells from TCR1640 animals. Finally, the implication of new cell adhesion molecules in the development and maintenance of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis has been suggested by *in vitro* study of melanoma cell adhesion molecule (CD146) and activated leucocyte cell adhesion molecule (CD166).

The results obtained in this study suggest that the TCR1640 model is a valuable asset in the study of neuroimmune diseases such as multiple sclerosis. It could also be used to validate new therapeutic strategies for the treatment of this disease.

**Keywords** : Blood-brain barrier, central nervous system, neuroinflammation, neurovascular unit, multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, cell adhesion molecules.

# Table des matières

Introduction.....	1
1. La barrière hémato-encéphalique et ses cellules endothéliales.....	1
1.1 Complexes protéiques de jonction.....	3
1.2 La cellule endothéliale au cœur de l'unité neurovasculaire.....	6
2. Processus neuroinflammatoires et sclérose en plaques.....	10
2.1 Reconnaissance antigénique et activation des lymphocytes.....	10
2.2 Migration transendothéliale des leucocytes.....	11
2.3 Impact structurel des facteurs proinflammatoires sur la barrière hémato-encéphalique et l'unité neurovasculaire.....	13
2.4 La sclérose en plaques.....	15
2.5 Traitement de la sclérose en plaques.....	17
3. La sclérose en plaques et son modèle expérimental, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale.....	20
3.1 Encéphalomyélite auto-immune expérimentale.....	20
3.2 Le modèle TCR1640.....	25
Hypothèse et objectifs.....	27
Matériel et méthodes.....	28
1. Génotypage des animaux.....	28
2. Observations cliniques.....	29
3. Prélèvement d'organes et conservation.....	30
4. Préparation du tissu murin et des lames.....	31
5. Coloration de la myéline.....	31
6. Immunohistofluorescence et microscopie confocale.....	32
7. Isolation de leucocytes.....	32
8. Immunomarquage des leucocytes et cytométrie de flux.....	33
9. Transfert adoptif de lymphocytes CD4+ et traitement avec l'anticorps bloquant anti VLA-4 :.....	35
10. Analyse et tests statistiques.....	35
Résultats.....	36
1. Caractérisation clinique.....	36
2. Inflammation au sein de l'UNV.....	37
3. Profil immunitaire des souris TCR1640.....	46
4. Modulation de l'EAE dans le modèle TCR1640.....	62
Discussion.....	67
Conclusion.....	77
Bibliographie.....	78
Annexe – Figures et tableaux supplémentaires.....	90

## Liste des schémas et tableaux

Schéma 1 : La cellule endothéliale au cœur de l'unité neurovasculaire. ....	9
Tableau 1 : Échelle de score clinique (paralysie) .....	29
Tableau S1 : Anticorps utilisés pour l'immunohistofluorescence .....	93
Tableau S2 : Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.....	93

## Liste des figures

Figure 1. Caractérisation clinique de l'EAE spontanée dans la colonie TCR1640. ....	38
Figure 2. Coloration au LFB/H&E à différents stades d'EAE spontanée. ....	39
Figure 3. Activation microgliale et infiltration périvasculaire de macrophages lors de l'EAE spontanée.....	41
Figure 4. Infiltration lymphocytaire et altération de l'expression de ZO-1 lors des phases aiguë et chronique de l'EAE spontanée.....	42
Figure 5. Déstructuration de l'expression de la molécule JAM-A, associée au phénomène inflammatoire d'astroglie, lors de l'EAE spontanée. ....	44
Figure 6. Perte de l'étanchéité de la BHE associée à l'augmentation de la molécule VCAM-1 lors de l'EAE spontanée.....	45
Figure 7. Variation dans les populations relatives de lymphocytes T chez les animaux TCR1640.....	49
Figure 8. Variation dans le nombre absolu de leucocytes présents dans différents organes chez les animaux TCR1640.....	50
Figure 9. Augmentation de la production d'IFN $\gamma$ par les lymphocytes T cytotoxiques dans le modèle TCR1640. ....	53
Figure 10. Augmentation de la production d'IL-17 par les lymphocytes T. ....	54
Figure 11. Augmentation du pourcentage de cellules T régulatrices au sein du SNC dans les phases actives de l'EAE spontanée.....	56
Figure 12. Augmentation de l'expression de VLA-4 dans le modèle TCR1640.....	51
Figure 13. Augmentation de l'expression de MCAM dans le modèle TCR1640.....	60
Figure 14. Augmentation de l'expression d'ALCAM dans le modèle TCR1640. ....	61
Figure 15. Profil d'activation des lymphocytes T CD4+ en vue d'un transfert adoptif de dans le modèle TCR1640. ....	64
Figure 16. Développement d'une forme cyclique d'EAE lors du transfert adoptif dans des animaux WT de lymphocytes T CD4+ réactivés en provenance de souris TCR1640.....	65
Figure 17. Le traitement avec l'anticorps anti-VLA-4 retarde l'apparition de symptômes d'EAE dans le modèle de transfert adoptif chez les souris TCR1640.....	66
Figure S1. Génotypage des animaux TCR1640.....	90
Figure S2. Stratégie d'analyse pour l'identification des populations leucocytaires étudiées. ...	91
Figure S3. Stratégie d'analyse par quadrant pour la quantification de l'expression des molécules à l'étude. ....	92



## Liste des abréviations

ABC : *ATP binding cassette*  
ACM : milieu conditionné par les astrocytes  
ALCAM : *activated leukocyte cell adhesion molecule*  
BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*  
BHE : barrière hémato-encéphalique  
CAR : *coxsackievirus and adenovirus receptor*  
CD : *cluster of differentiation*  
CE : cellule endothéliale  
CE-BHE : cellule endothéliale de la barrière hémato-encéphalique  
Cl : claudine  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
CTX : *cortical thymocyte marker in Xenopus*  
EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale  
EBV: virus Epstein-Barr  
EMR1: *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*  
ESAM: *endothelial cell-selective adhesion molecule*  
FBS : *fetal bovine serum*  
FoxP3: *forkhead box P3*  
GA : acétate de glatiramer  
GDNF : *glial cell line-derived neurotrophic factor*  
GFAP: *glial fibrillary acidic protein*  
GLYCAM-1 : *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*  
GWAS: *genome-wide association study*  
ICAM-1 : *intercellular cell adhesion molecule-1*  
IFN $\gamma$  : interféron  $\gamma$   
IL : interleukine  
IL-17R : récepteur de l'IL-17  
i.p. : intra-péritonéale  
IP-10 : interferon  $\gamma$ -induced protein 10  
JS : jonction serrée  
JA : jonction *adherens*  
JAM : *junctional adhesion molecule*  
LCR : liquide céphalo-rachidien  
LEMP : leucoencéphalite multifocale progressive  
LFA-1 : *leukocyte function associated-1*  
LFB/H&E : coloration au Luxol Fast Blue, à l'hématoxyline et à l'éosine  
MAGUK: *membrane associated guanylate kinases*  
MCP-1 : *monocyte chemotactic protein-1*  
MIP-1 $\alpha$  : *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*   
MMP : métalloprotéases matricielles  
MAG: *myelin associated glycoprotein*  
MBP: *myelin basic protein*  
MCAM: *melanoma cell adhesion molecule*

MOG : *myelin oligodendrocyte glycoprotein*  
MRP1 : *multidrug resistance protein 1*  
O/N : *overnight*  
PBS : *phosphate buffered saline*  
PCR : *polymerase chain reaction*  
PECAM-1 : *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*  
PDZ : *postsynaptic density protein PSD95, drosophila tumor suppressor dlg-A, ZO-1*  
PLP : *proteolipid protein*  
PMA : *phorbol 12-myristate 13-acetate*  
PFA : *paraformaldéhyde*  
RANTES : *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*  
ROS : *espèces réactives de l'oxygène*  
SEP : *sclérose en plaques*  
SNC : *système nerveux central*  
SH3 : *sulf-hydryl*  
TA : *température ambiante*  
TCR : *récepteur des cellules T*  
TGF- $\beta$  : *transforming growth factor  $\beta$*   
TNF $\alpha$  : *tumor necrosis factor- $\alpha$*   
Treg : *lymphocytes T régulateurs*  
UNV : *unité neurovasculaire*  
VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule-1*  
VE-cadhérine : *vascular endothelial cadherin*  
VEGF : *vascular endothelial growth factor*  
VLA-4 : *very late antigen-4*  
WT : *sauvage*  
ZO : *Zonula Occludens*

*À ma mère et mon père,  
Qui m'ont transmis leur amour pour la science  
Et pour la langue française*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Alexandre Prat de m'avoir accordé une place au sein de son équipe. Mon séjour dans son laboratoire m'aura appris non seulement beaucoup de choses sur la science, mais surtout beaucoup de choses sur moi-même. Merci surtout d'avoir fait preuve de compréhension dans les moments plus difficiles.

Merci à Mme Lyne Bourbonnière d'avoir été présente à toutes les étapes de ce projet, et d'avoir offert son aide à tout moment, sans rien demander en retour.

Merci au Dr Catherine Larochelle et à Marc-André Lécuyer pour l'aide qu'ils m'ont apportée pour le volet immunité de ce projet. J'espère pouvoir continuer à travailler avec vous, sans égard pour la supériorité de l'une ou l'autre de vos molécules!

Merci au Dr Jorge Ivan Alvarez et à Mlle Simone Terouz pour leur patience et leurs judicieux conseils pour la caractérisation *in situ* et la microscopie confocale.

Merci à Sandra Larouche pour son soutien technique et sa bonne humeur, ainsi qu'à toute l'équipe de l'animalerie de l'hôpital Notre-Dame, plus particulièrement Suzanne Vincent, Marie-Claude Therrien et le Dr Hélène Héon. Merci de m'avoir fait confiance, ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Merci au Dr Hania Kebir et au Dr Romain Cayrol, d'avoir donné leur opinion sur mon travail et d'avoir non seulement partagé leurs connaissances, mais aussi leur amitié. Merci au Dr Nathalie Arbour d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions.

Merci au Dr Hartmut Wekerle d'avoir permis à notre laboratoire l'étude du modèle animal développé par son équipe. Merci au Dr Takahiro Katayama d'avoir mis au point le transfert adoptif dans le modèle TCR1640.

Merci à tous ceux qui, de près ou de loin, ont fait de mon travail de recherche une expérience que je ne regretterai jamais : Dr Igal Ifergan, Julia Pollman, Dr Cornelia Podjaski, Fatma Zaguia, Dr Camille Pittet, Dr Steve Gendron, Lamia Naouel Hachehouche, Casper

Briels, Dr Soufiane Ghannam, Janet Laganière, Aurore Dodelet-Devillers, Dr Akiko Nakano, Vincent Sénécal, François Gagnon, Dr Émilie Viel et Diane Beauseigle.

Merci enfin à ma famille et à mes amis. La route serait longue sans votre soutien et votre amour.

# Introduction

Le traitement de l'information nerveuse s'est centralisé au cours de l'évolution afin de pouvoir traiter des tâches motrices, sensorielles et cognitives de plus en plus complexes. Le cerveau de l'homme, même s'il ne représente que 2 % de sa masse corporelle totale, nécessite 15 % du débit cardiaque, 20 % de l'apport en oxygène et plus du quart de l'apport systémique en glucose. Cette demande métabolique énorme ne pourrait être comblée sans la mise en place d'un réseau vasculaire hautement développé, de façon à assurer la plus grande surface de contact possible entre le réseau neuronal et les éléments sanguins. Cependant, le bon fonctionnement de la transmission neuronale requiert des conditions environnementales contrôlées et les capacités de régénération au sein du système nerveux central (SNC) sont limitées; compte tenu du haut régime métabolique qui doit être maintenu en permanence, des fluctuations mineures dans les concentrations de nutriments, d'oxygène ou de déchets métaboliques peuvent avoir des répercussions graves. Une spécialisation de l'endothélium vasculaire cérébral permet à la fois une grande quantité d'échanges avec le compartiment sanguin et une régulation très sévère de ces derniers.

## 1. La barrière hémato-encéphalique et ses cellules endothéliales

Le système vasculaire cérébral se développe en trois phases : la vasculogénèse, l'angiogénèse, puis la « barrière-génèse », lors de laquelle les cellules endothéliales (CE) cérébrales acquièrent plusieurs propriétés spécifiques, et se transforment en CE de la barrière hémato-encéphalique (CE-BHE). Les CE-BHE sont liées entre elles par des complexes de jonction protéiques qui permettent un contrôle strict de la perméabilité paracellulaire, et qui entraînent une augmentation de la résistance électrique trans-endothéliale<sup>1</sup>. Elles sont également dépourvues de fenestration, et présentent une activité réduite en pinocytose et en endocytose par rapport aux CE d'autres organes.

Cette étanchéité paracellulaire de la BHE exige le déploiement d'une grande variété de systèmes de transport et de récepteurs spécifiques, afin de permettre un échange suffisant de nutriments et de solutés pour satisfaire aux besoins énergétiques et métaboliques du SNC. Parmi ces systèmes, on compte notamment le transporteur de glucose Glut-1<sup>2</sup> et le récepteur de la transferrine<sup>3</sup>, qui permettent le transport de nutriments, ainsi que des glycoprotéines P et le transporteur de la famille ABC (*ATP binding cassette*) MRP-1 (*Multidrug resistance protein 1*), qui facilitent la sécrétion dans le sang des métabolites toxiques et liposolubles<sup>4</sup>.

Les CE-BHE sont enrichies en mitochondries, et démontrent une activation augmentée de plusieurs de leurs enzymes métaboliques, telles que la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, la phosphatase alcaline et la glutathion S-transférase<sup>5</sup>.

Enfin, les CE-BHE sont recouvertes du côté apical par une couche glycosylée chargée négativement, formée par les résidus d'acide sialique provenant de certaines glycoprotéines acides. Du côté baso-latéral, la membrane basale riche en glycosaminoglycanes, en glycoprotéines acides et en protéoglycanes renforce l'étanchéité de la BHE<sup>5</sup>.

L'ensemble de ces propriétés est à la base de la formation de la BHE, et est obtenu, maintenu et modifié grâce à l'interaction des CE-BHE avec différentes populations de cellules gliales environnantes.

Il est intéressant de noter qu'il existe une variabilité physiologique dans l'étanchéité de la BHE, dans certaines régions du SNC. Par exemple, les organes circumventriculaires (l'épiphyse, l'éminence médiane, la neurohypophyse, l'area postrema, l'organe vasculaire de la lame terminale et l'organe subfornical), présentent des capillaires fenestrés pour permettre la régulation de l'homéostasie et la mise en circulation systémique de facteurs sécrétés par des neurones spécialisés. Les plexus choroïdes, qui sont responsables de la sécrétion du liquide céphalo-rachidien (LCR), ainsi que la rétine possèdent également des propriétés barrières adaptées à leurs fonctions<sup>6</sup>.

## 1.1 Complexes protéiques de jonction

Deux types de complexes protéiques sont présents à la jonction entre les CE. Les jonctions serrées (JS) sont situées au pôle apical (ou luminal) de la section adjacente de deux CE, tandis que les jonctions *adherens* (JA) sont situées dans la partie basolatérale de la membrane plasmique<sup>7</sup>. En plus d'être tenues en grande partie responsables du phénotype imperméable de la BHE, les JS permettent également la ségrégation des lipides apicaux et basolatéraux dans la portion extracellulaire (ou exocytoplasmique) de la membrane plasmique<sup>7, 8</sup>. Les JS sont composées de deux catégories de protéines : des protéines transmembranaires, qui agissent de façon homo- ou hétérophilique avec les cellules adjacentes, et des protéines intra-cytoplasmiques (ou protéines associées aux JS), qui ancrent les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine, assurant ainsi la stabilité des complexes de jonction.

Trois types de protéines transmembranaires forment la base des JS. La première à avoir été identifiée est l'occludine<sup>9</sup>. Il s'agit d'une phosphoprotéine de 65 KDa possédant 4 domaines transmembranaires<sup>10</sup>, dont les extrémités C- et N-terminales sont intracytoplasmiques. Bien que la souris déficiente en occludine présente quelques anomalies histologiques, l'intégrité de la BHE ne semble pas compromise dans ces animaux<sup>9</sup>. L'occludine est impliquée dans l'organisation de la structure des JS<sup>11</sup> et dans l'extravasation des leucocytes<sup>12, 13</sup>.

Les claudines (Cl, grande famille de 24 protéines) ont une structure semblable à celle de l'occludine. Plus particulièrement, Cl-1, Cl-3, Cl-5 et Cl-12 sont exprimées dans le SNC<sup>14, 15, 16, 17</sup>. Ce sont des protéines de 22 KDa, qui possèdent quatre domaines transmembranaires<sup>18, 19, 20</sup>, et qui peuvent présenter des interactions homo- et hétérotypiques avec les protéines des cellules adjacentes<sup>18, 21</sup>. La présence de claudines est essentielle pour permettre la formation des JS. Cl-3 et Cl-5 sont d'ailleurs exprimées exclusivement par les CE, et ne sont pas présentes sur les cellules épithéliales<sup>14, 16</sup>. La souris déficiente en Cl-5 meurt quelques heures après la naissance, et sa BHE présente une augmentation de la perméabilité aux molécules de petite taille. La présence de Cl-5 au sein de la JS aurait également un rôle important dans le



contrôle du transport paracellulaire<sup>16</sup>, ainsi qu'une fonction promotrice dans l'activation de la métalloprotéase matricielle (MMP)-2<sup>22</sup>.

Les protéines CTX (*Cortical Thymocyte marker in Xenopus*), plus particulièrement les protéines JAM (*Junctional Adhesion Molecule*), représentent la dernière famille de protéines des JS<sup>23</sup>. Ces protéines possèdent deux domaines extracellulaires semblables aux immunoglobulines (*Ig-like*), un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracytoplasmique<sup>23</sup>. JAM-B, -C et -D sont exprimées exclusivement par les CE. JAM-A, quant à elle, est exprimée par les CE et les cellules épithéliales. Via ses interactions homophiliques, cette dernière joue un rôle précoce dans la formation des JS<sup>13, 24</sup>, et pourrait être impliquée dans la polarisation cellulaire<sup>25</sup>. D'autres protéines CTX, comme ESAM (*Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule*) et CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*), sont également exprimées par les CE-BHE. Leur rôle dans l'étanchéité de la BHE reste à préciser<sup>26, 27</sup>.

Toutes ces protéines transmembranaires interagissent, par le biais de leur domaine PDZ (*Postsynaptic density protein PSD95, Drosophila tumor suppressor dlg-A, ZO-1*) C-terminal, avec les protéines de la famille MAGUK (*membrane associated guanylate kinases*) telles que les protéines ZO (*Zonula Occludens*) ZO-1, ZO-2 et ZO-3<sup>28, 29 30, 31, 32</sup>. Les protéines ZO sont constituées de 3 domaines PDZ et d'un groupe SH3 (sulf-hydryl), ce qui permet l'ancrage au cytosquelette d'actine ainsi que la formation de complexes hétérodimériques entre elles<sup>33</sup>. ZO-1 est essentielle à la stabilité des complexes protéiques des JS, puisque la modification de son expression entraîne une augmentation de la perméabilité de la BHE<sup>34</sup>. En plus de leur rôle d'ancrage, les protéines ZO ont vraisemblablement un rôle dans la signalisation intracellulaire<sup>35</sup> et semblent également impliquées dans la localisation de l'occludine au pôle apical des cellules endothéliales<sup>36</sup>.

Tout comme les JS, les JA sont constituées de protéines transmembranaires, liées au squelette d'actine par des protéines intracytoplasmiques. Les JA sont constituées de deux protéines transmembranaires principales : VE-cadhérine (*Vascular endothelial cadherin*) et PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*, ou CD31). Bien que les souris déficientes en PECAM-1 présentent une BHE normale dans des conditions physiologiques<sup>37</sup>,

l'endothélium cérébral de ces animaux présente des propriétés altérées (augmentation de la perméabilité vasculaire associée à l'infiltration de monocytes) dans des conditions neuroinflammatoires<sup>38</sup>. Ces résultats suggèrent que PECAM-1 promeut l'étanchéité de la BHE et nuit à la migration leucocytaire transendothéliale.

Les protéines transmembranaires des JA interagissent principalement avec les protéines cytoplasmiques de la famille des caténines (en particulier  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -caténines et p120<sup>cas</sup>)<sup>39, 40</sup>. Les caténines agissent aussi comme facteurs de transcription, puisqu'elles peuvent migrer vers le noyau lors d'une modification de l'expression des protéines des JA, afin d'activer la transcription de certains gènes<sup>41</sup>. Lors de la « barrière-génèse », les JA apparaissent avant les JS, et pourraient avoir un rôle dans la formation de ces dernières. En effet, l'apparition de VE-cadhérine entraînerait l'augmentation de la transcription du gène codant pour Cl-5 dans les CE<sup>42</sup>.

Comme les complexes protéiques de jonction sont stabilisés grâce à leur interaction avec le cytosquelette d'actine, un cytosquelette anormal compromettra la formation et le maintien de l'intégrité de la BHE (comme c'est le cas par exemple chez la souris déficiente en dystrophine)<sup>43</sup>. De plus, la plupart des molécules impliquées dans les grandes voies de signalisation intracellulaire (tyrosine kinases, Ca<sup>2+</sup>/calmoduline, protéines G hétérotrimériques, AMPc, phospholipase C, etc.) affectent également la perméabilité paracellulaire, probablement via leur influence sur la réorganisation du cytosquelette d'actine<sup>44, 45</sup>.

En bref, les protéines transmembranaires des JS (principalement, l'occludine, Cl-3, Cl-5 et JAM-A) et des JA (VE-cadhérine et PECAM-1) se lient au cytosquelette via des protéines cytoplasmiques (respectivement, les ZO et les caténines) et forment des complexes protéiques intercellulaires qui restreignent la circulation du compartiment sanguin vers le compartiment du système nerveux central (voir schéma 1). Les voies de signalisation intracellulaire majeures sont impliquées dans plusieurs fonctions des JS et des JA, notamment dans la régulation de l'expression des molécules ainsi que dans la polarisation cellulaire.

## 1.2 La cellule endothéliale au cœur de l'unité neurovasculaire

Bien que les complexes protéiques de jonction formés par les JS et par les JA jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité endothéliale au sein du SNC, différentes populations cellulaires et plusieurs autres complexes protéiques sont essentiels pour l'apparition et le maintien des propriétés uniques de la BHE. L'unité de ce système est possible grâce aux contacts physiques entre les différents types cellulaires, ainsi qu'à la sécrétion locale de substances solubles. Cette entité, que l'on appelle l'unité neurovasculaire (UNV), est hautement plastique, ce qui permet à la BHE de s'adapter afin de maintenir une fonction optimale, autant dans des conditions physiologiques que pathologiques. En plus des CE-BHE, l'UNV est constituée des astrocytes, de la microglie, des péricytes et de la membrane basale (voir schéma 1). Elle reçoit également des informations en provenance des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins ainsi que de différentes populations neuronales. L'UNV permet le contrôle de trois grandes fonctions associées à la BHE : le débit sanguin cérébral, l'étanchéité de la BHE et l'interface neuroimmune qui permet l'extravasation des leucocytes du sang vers le parenchyme cérébral.

À cause de la proximité physique des pieds astrocytaires avec les CE-BHE, le rôle des astrocytes dans le développement, la différenciation et le maintien des propriétés de la BHE a été étudié en détail<sup>46, 47</sup>. *In vitro*, la présence d'astrocytes ou de milieu de culture conditionné par les astrocytes (ACM) entraîne l'expression de propriétés spécifiques de la BHE par des CE (notamment, une augmentation de l'expression de l'occludine, de Cl-5 et de ZO-1)<sup>48, 49, 50, 51</sup>. Lors du développement, les astrocytes permettent de stopper l'angiogenèse et d'induire la maturation des CE-BHE en diminuant l'expression du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et en augmentant l'expression de l'angiotensine I, respectivement<sup>52</sup>.

Les astrocytes sécrètent aussi le TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* )<sup>53</sup>, le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), le GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*)<sup>54</sup> et l'angiotensine II<sup>55</sup>. Toutes ces substances sont impliquées dans une grande variété d'activités, qui ont toutes des répercussions importantes sur la perméabilité de la BHE. Notons entre autres l'impact sur la régulation de l'expression des protéines des JS et de différents

transporteurs spécifiques, la production de facteurs anticoagulants par les CE, ainsi que la régulation de la réponse inflammatoire<sup>56, 57, 58</sup>.

Les différents facteurs solubles sécrétés par les astrocytes atteignent les CE à travers la membrane basale qui sépare les pieds astrocytaires de l'endothélium vasculaire. La membrane basale est formée de deux couches protéiques : une lame basale d'origine épithéliale et une lame réticulaire d'origine conjonctive, entre lesquelles se trouve l'espace périvasculaire. La matrice extracellulaire qui compose la membrane basale intervient dans la régulation des CE, notamment en concentrant les molécules solubles présentes dans l'espace périvasculaire et en favorisant le contact de celles-ci avec la membrane des cellules endothéliales<sup>59</sup>.

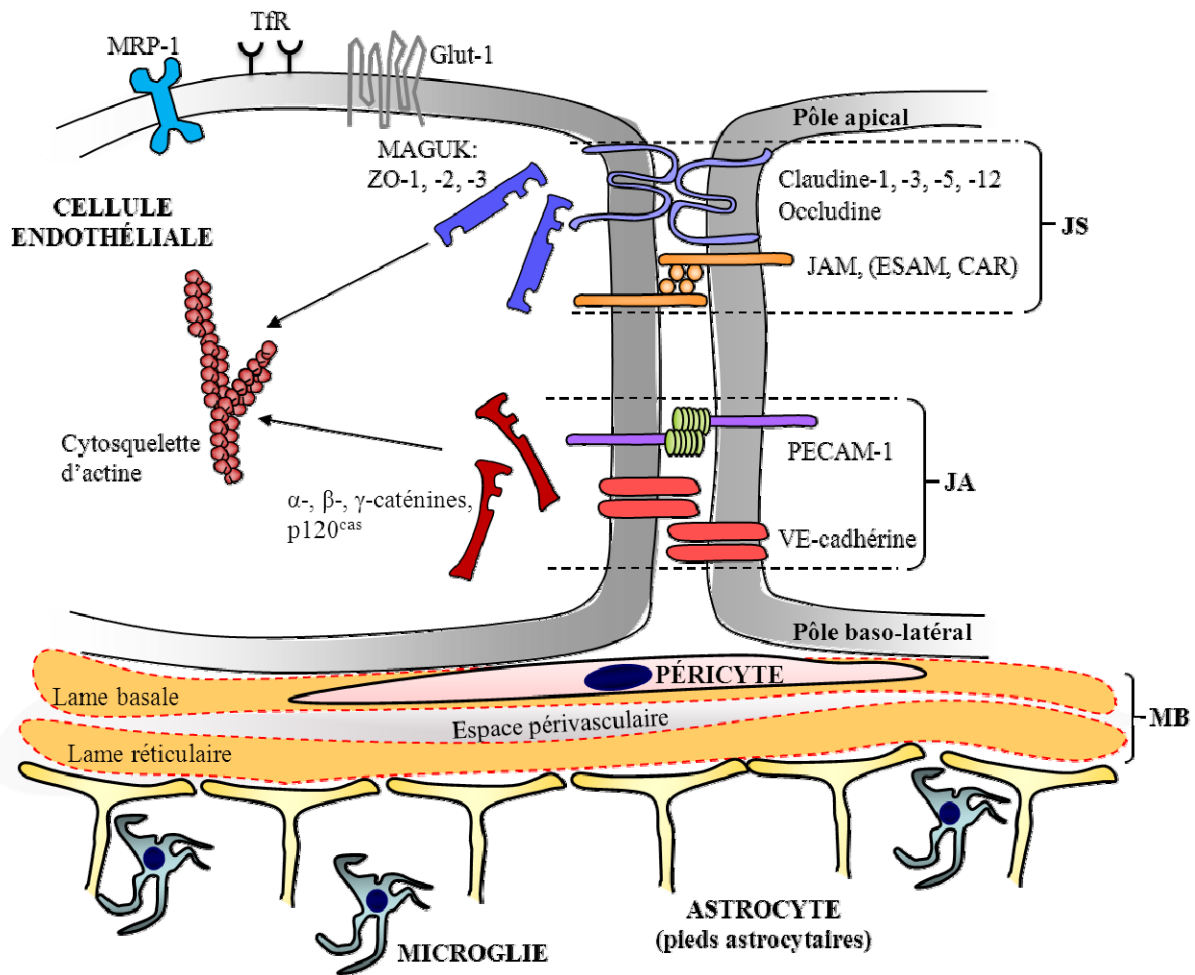
La laminine, le collagène IV, la fibrilline, la fibronectine ainsi que des métalloprotéases matricielles (MMP) se retrouvent dans cette matrice protéique. Les MMP permettent, dans des conditions physiologiques, le remodelage de la matrice extracellulaire et la dégradation de certains éléments sanguins (limitant ainsi l'accès au parenchyme cérébral)<sup>60, 61</sup>. Lors de processus inflammatoires, une surexpression de ces enzymes protéolytiques (certains leucocytes activés pouvant également produire des MMP) peut compromettre, voire détruire la matrice extracellulaire, ce qui facilite la transmigration leucocytaire et augmente la perméabilité de la BHE<sup>62, 63</sup>.

Les péricytes projettent de longs prolongements cytoplasmiques à la surface des CE et forment des jonctions avec celles-ci via des complexes protéiques tels que les JS<sup>64</sup>. Les péricytes, via la sécrétion de facteurs de croissance, jouent un rôle précoce dans la maturation et le maintien du système vasculaire (avant l'apparition des astrocytes)<sup>65, 66</sup>. Ils peuvent également interagir directement avec la matrice extracellulaire. Enfin, les péricytes semblent également intervenir dans la régulation du transport transendothélial<sup>67</sup>.

L'input provenant de projections neuronales peut être transformé au sein de l'UNV en réponse microvasculaire, de façon à permettre le contrôle local et précis du flot sanguin en fonction de l'activité métabolique<sup>68, 69</sup>. Une population de neurones corticaux, dont l'activité est temporellement couplée à des changements dans la perfusion cérébrale a d'ailleurs été identifiée<sup>70, 71</sup>. Comme les neurones sont aussi en contact direct avec les astrocytes, il est

plausible que ces derniers jouent également un rôle dans la modulation locale de la perméabilité des capillaires sanguins<sup>57, 72</sup>. Évidemment, d'autres phénomènes, comme la sécrétion de substances vasoactives par différents types cellulaires ou les concentrations environnantes en oxygène, en glucose et en ions, jouent également un rôle prédominant dans la modulation spatio-temporelle du flot sanguin cérébral.

Pour résumer, les CE-BHE sont en contact avec trois environnements différents : le sang, qui contient différents facteurs solubles et des leucocytes circulants, les CE adjacentes, qui s'influencent mutuellement pour assurer une réponse locale homogène, et les autres composantes de l'UNV, dont les cellules gliales, les péricytes et les neurones. Toutes ces composantes permettent un contrôle précis dans le temps et dans l'espace des propriétés uniques de la BHE.



**Schéma 1. La cellule endothéliale au cœur de l'unité neurovasculaire.**

Les CE-BHE présentent une expression accrue de différents transporteurs (MRP-1, TfR, Glut-1) afin de combler aux besoins métaboliques spécifiques du SNC. Les complexes protéiques des jonctions serrées (JS) (Claudines, occludine, JAM et protéines ZO) et des jonctions adhérentes (JA) (PECAM-1, VE-cadhérine, caténines) interagissent avec le cytosquelette d'actine et contribuent à l'étanchéité de la BHE. Les CE interagissent avec les astrocytes et les microglies via la membrane basale (MB), ainsi qu'avec les péricytes, pour former l'UNV. *Adapté de A. Dodelet-Devillers (2008) et C. Larochelle (2013).*

## 2. Processus neuroinflammatoires et sclérose en plaques

L'étanchéité de la BHE confère au SNC un statut immunologique unique. Les complexes protéiques de jonction des CE-BHE et les différentes structures de l'UNV limitent l'accès des leucocytes au parenchyme cérébral. De plus, le SNC présente d'autres particularités par rapport à son système immunitaire : le cerveau est en effet dépourvu de réseau de drainage lymphatique conventionnel, ainsi que de cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles. Bien que les microglies soient considérées comme les CPA résidentes du SNC, ces cellules n'expriment pas de façon constitutive le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II nécessaire à l'activation des cellules immunitaires effectrices. L'expression du CMH de classe II peut néanmoins être induite lors de l'activation des microglies<sup>73</sup>.

Bien que le SNC possède un certain « privilège immunitaire »<sup>74</sup>, les leucocytes du système immunitaire périphérique doivent pouvoir y circuler afin d'assurer la protection des cellules cérébrales en cas d'attaque infectieuse (si une particule virale réussit à traverser la BHE, par exemple). On appelle ce phénomène la surveillance immunitaire. Dans des conditions inflammatoires, l'arrivée massive de leucocytes et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par ceux-ci ainsi que par les cellules gliales activées entraînent malheureusement la perte de la régulation homéostatique de la BHE.

### 2.1 Reconnaissance antigénique et activation des lymphocytes

Les lymphocytes T sont au cœur du phénomène de reconnaissance antigénique qui permet de mobiliser le système immunitaire adaptatif contre une attaque exogène, et participent donc activement à la surveillance immunitaire. Les lymphocytes T possèdent un récepteur spécifique, appelé récepteur des cellules T, ou TCR. Le TCR est un complexe polypeptidique qui permet la reconnaissance d'un antigène spécifique. Il est composé de deux chaînes variables et associé au co-récepteur CD3 (*cluster of differentiation 3*). Dans des conditions physiologiques, les lymphocytes T sont cependant inactifs; on parle alors de

cellules naïves. Pour devenir effectrices, les cellules T doivent rencontrer l'antigène qui est spécifique à leur TCR, et qui leur sera présenté par une CPA via le CMH. Les cellules T CD4+ (ou lymphocytes T auxiliaires) sont activés via une interaction avec le CMH de classe II, qui est exprimé uniquement par les CPA professionnelles (macrophages, cellules dendritiques, etc.). Les cellules CD8+ (ou lymphocytes T cytotoxiques, CTL), sont quant à elles activées via une interaction avec le CMH de classe I, exprimé de façon quasi ubiquitaire dans l'organisme. Cependant, seul le CMH de classe I exprimé par les CPA permet l'activation des lymphocytes T CD8+<sup>75</sup>.

Lors de l'activation initiale d'un lymphocyte, c'est donc la CPA qui entre d'abord en contact avec l'antigène. Après phagocytose et internalisation, l'antigène est apprêté afin de se loger dans la niche peptidique du CMH, pour finalement être exprimé à la surface de la CPA. Cette dernière migre vers les organes lymphoïdes secondaires, où se retrouvent les lymphocytes T naïfs après avoir terminé leur maturation dans le thymus. L'activation antigénique est initiée par l'interaction entre le peptide antigénique logé dans la niche peptidique de la molécule du CMH sur la CPA, et le complexe TCR-CD3 du lymphocyte T. Dans des conditions pathologiques, l'expression de molécules de co-stimulation par la CPA (CD80/CD86) et le lymphocyte T (CD28 et CD152), ainsi que les interactions spécifiques TCR-CMH (entre CD4 et le CMH de classe II, ou entre CD8 et le CMH de classe I) permettent l'activation du lymphocyte T, qui entame sa différenciation en cellule mémoire ou effectrice. L'activation du lymphocyte T entraîne une augmentation de la production de cytokines ainsi que de l'expression de certains marqueurs de surface, comme CD25 ou le récepteur de l'IL-2. La cellule T quitte les organes lymphoïdes secondaires et voyage dans l'organisme à la recherche de son antigène spécifique<sup>75</sup>.

## **2.2 Migration transendothéliale des leucocytes**

Afin d'atteindre le parenchyme cérébral, les leucocytes doivent quitter le compartiment sanguin en franchissant les barrières protéiques des JS et des JA présentes entre les CE-BHE. L'adhésion leucocytaire aux CE déclenche une cascade de signalisation qui cause une déstructuration des composantes des JS et des JA, ce qui entraîne une augmentation de la



perméabilité de la BHE<sup>76</sup>. Ce phénomène peut également être influencé par l'augmentation de la pinocytose des CE elles-mêmes ainsi que par la formation de canaux transendothéliaux. C'est cette dernière propriété qui explique que les leucocytes peuvent non seulement migrer à la jonction entre deux CE (route paracellulaire), mais également à travers une CE (route transcellulaire)<sup>77</sup>. Ce processus, appelé migration transendothéliale, extravasation ou diapédèse, se déroule en plusieurs étapes<sup>78</sup>.

Les leucocytes circulants doivent ralentir afin de pouvoir s'accrocher à la paroi endothéliale. C'est la structure même du réseau vasculaire, grâce à ses capillaires de petite taille, qui permet tout d'abord de ralentir les cellules immunitaires. Celles-ci se mettent ensuite à rouler sur la paroi endothéliale luminale, grâce à des interactions de faible affinité entre les sélectines (P- et E-sélectines) et certaines molécules d'adhésion cellulaire (CAM) (GLYCAM-1, *Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*) exprimées par les CE-BHE et leurs ligands exprimés à la surface des leucocytes (respectivement, PSGL-1, ESL-1 et L-sélectine)<sup>79, 80, 81</sup>. Ce processus a lieu en tout temps dans les capillaires sanguins, et permet aux cellules immunitaires de sonder les CE en quête de signes d'inflammation.

Dans des conditions inflammatoires, cette première interaction entre les CE et les leucocytes favorise la production de chimiokines pro-inflammatoires, telles que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, ou CCL2), RANTES (*Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, ou CCL5), MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  ou CCL4) et IL-8 (interleukine-8, ou CXCL8)<sup>82, 83</sup>. Ces molécules agissent sur les leucocytes via des récepteurs couplés aux protéines G, et induisent l'augmentation de l'avidité des intégrines LFA-1 (*leukocyte function associated-1*, ou intégrine  $\alpha$ L $\beta$ 1) et VLA-4 (*very late antigen-4*, ou intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 1) pour leurs ligands<sup>79</sup>. Les chimiokines agissent aussi directement sur les CE-BHE et stimulent l'expression des ligands des intégrines, soit ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*) et VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). En réponse à la stimulation par les chimiokines proinflammatoires, l'augmentation des interactions entre les CAM des CE-BHE et les intégrines leucocytaires entraîne le ralentissement, puis l'arrêt des cellules immunitaires sur la paroi endothéliale<sup>84, 85</sup>.

Une fois le leucocyte arrêté, des interactions complexes entre CAM, intégrines et complexes protéiques de jonction permettent la migration de la cellule à travers la couche de

CE-BHE. La cellule immunitaire doit également franchir la membrane basale et sa dense matrice extracellulaire. La diminution de l'expression de la laminine et l'augmentation de l'activité des MMP (principalement MMP-2 et MMP-9) contribuent à ce phénomène<sup>79, 86</sup>.

Évidemment, ces évènements sont en réalité beaucoup plus complexes, et nécessitent un réseau d'interactions spatio-temporelles plus étendu que ce qui est décrit ici. Notamment, certaines CAM et leurs ligands sont impliqués dans la transmigration de sous-populations leucocytaires spécifiques. Il est également important de noter que la diapédèse a un impact notoire sur l'activation des cellules immunitaires. L'exemple le plus frappant de ce phénomène se retrouve chez les monocytes, qui mûrissent en macrophages (un type de CPA professionnelles) lors de la transmigration<sup>87</sup>.

### **2.3 Impact structurel des facteurs proinflammatoires sur la barrière hémato-encéphalique et l'unité neurovasculaire**

L'augmentation de la perméabilité de la BHE suite à la transmigration des leucocytes est accompagnée par la perte du phénotype spécifique acquis par les CE-BHE au cours de leur différenciation. En plus de la diminution de l'expression des molécules des JS et des JA<sup>14</sup> et de l'augmentation de la pinocytose, on constate le retour de l'expression de la molécule MECA-32, présente dans les CE embryonnaires, mais qui cesse normalement d'être exprimée par les CE-BHE matures<sup>88</sup>.

L'accumulation de différents types de cellules infiltrantes (lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages) dans l'espace périvasculaire cérébral entraîne une augmentation importante dans la concentration locale de plusieurs facteurs proinflammatoires. Parmi ceux-ci, soulignons le rôle de l'IFN $\gamma$  (interféron  $\gamma$ ), du TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), des interleukines (IL) IL-23 et IL-17 ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS)<sup>87, 89</sup>.

Les CE-BHE expriment les récepteurs spécifiques au TNF $\alpha$  et à l'IFN $\gamma$ <sup>90, 91, 92</sup>. L'interaction de ces cytokines avec leurs ligands entraîne l'augmentation spécifique de l'expression de MCP-1, IL-8, RANTES et IP-10 (*interferon  $\gamma$ -induced protein 10*, ou CXCL10) par les CE-BHE<sup>83</sup>. *In vitro*, la stimulation combinée avec le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  cause

notamment l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 par les CE-BHE<sup>91, 93, 94, 95</sup>.

L'IL-23 est produite par les CPA de lignée myéloïde (monocytes, macrophages, cellules NK, neutrophiles, granulocytes et cellules dendritiques). Elle est impliquée dans l'expansion et le maintien d'une sous-population de cellules T auxiliaires (CD4+) proinflammatoires qui sécrètent l'IL-17 (cellules T<sub>H</sub>17)<sup>96, 97, 98</sup>. L'IL-17 entraîne l'augmentation de l'expression de MCP-1 et de l'IL-8 par les CE-BHE via l'interaction avec son récepteur (IL-17R). Elle a aussi une influence directe sur l'augmentation de la perméabilité de la BHE, puisqu'elle perturbe l'expression des molécules des JS occludine et ZO-1<sup>99, 100</sup>.

L'expression de ces cytokines au sein du parenchyme cérébral entraîne notamment une activation des cellules gliales. Les microglies deviennent activées, expriment le CMH de classe II et augmentent leur motilité de façon à pouvoir servir de CPA pour les cellules infiltrantes. On constate également un phénomène d'astroglie, qui se caractérise par une hypertrophie des pieds astrocytaires ainsi que par une augmentation de leur motilité. Les astrocytes et les microglies peuvent à leur tour augmenter leur production d'IL-1, d'IL-6 et de GM-CSF, contribuant ainsi au maintien d'un environnement proinflammatoire.

Dans un contexte neuroinflammatoire, des ROS sont notamment produites par la microglie activée et les macrophages<sup>101</sup>. Elles influencent la perméabilité de la BHE via la modification de l'expression ou de la phosphorylation de différentes protéines des JS (claudine-5, occludine, ZO-1)<sup>102, 103</sup>. La présence accrue de ROS a également des conséquences indirectes importantes sur la BHE, puisque les radicaux libres facilitent la migration transendothéliale des leucocytes et promeuvent l'expression du TNF- $\alpha$  et de différentes CAM par ces derniers<sup>104, 105</sup>. L'IL-17 pourrait également induire l'expression de ROS par les CE-BHE<sup>99</sup>.

Enfin, l'augmentation de la perméabilité de la BHE permet l'extravasation de composants (protéines, anticorps, nutriments, hormones) du sang normalement séquestrés dans les vaisseaux, et qui viennent se déposer dans le parenchyme cérébral. Toutes ces substances influencent à leur tour les différentes composantes de l'UNV et les cellules infiltrantes, et

peuvent créer une boucle de rétroaction positive favorisant le maintien d'un environnement proinflammatoire propice à l'activation continue des leucocytes et à l'établissement d'un milieu inflammatoire chronique. Par exemple, la présence de fibrinogène, une protéine sanguine impliquée dans la coagulation, dans le parenchyme cérébral entraîne l'activation microgliale<sup>106</sup>.

L'infiltration immunitaire du SNC et l'augmentation concomitante de la perméabilité de la BHE sont associées à bon nombre de pathologies cérébrales, comme la maladie d'Alzheimer<sup>107</sup>, l'accident vasculaire cérébral<sup>108</sup> et, plus particulièrement, la sclérose en plaques (SEP).

## 2.4 La sclérose en plaques

La SEP est une maladie neuroinflammatoire qui se caractérise par l'apparition de plaques focales périvasculaires de démyélinisation au sein du SNC, accompagnées par l'infiltration massive de leucocytes et la perte de l'étanchéité de la BHE.

L'étiologie de la maladie est encore méconnue, mais les recherches actuelles tendent à démontrer que des facteurs hormonaux, environnementaux et génétiques sont intimement liés à son développement<sup>109</sup>. L'influence hormonale est suggérée par le fait que la SEP affecte plus fréquemment les femmes que les hommes. Sa prévalence est également plus élevée dans les pays situés loin de l'équateur<sup>110, 111</sup>. Des études épidémiologiques tentent d'expliquer ce phénomène par l'exposition des populations à différents facteurs environnementaux, comme l'alimentation, l'exposition au soleil ou à certains virus (notamment, le virus Epstein-Barr, ou EBV)<sup>112, 113, 114</sup>. Des études génomiques de grande envergure (*genome-wide association studies*, ou GWAS) ont quant à elles identifié des associations significatives entre le polymorphisme de certains gènes associés au système immunitaire et le développement de la SEP, comme le gène du CMH HLA-DRB1<sup>115</sup>. Enfin, l'étude de l'incidence de la maladie chez les jumeaux identiques a montré qu'il y a une chance sur quatre qu'un jumeau développe la maladie quand l'autre en est atteint<sup>115</sup>.

Les symptômes de la SEP sont causés par la disparition partielle ou totale de la gaine de myéline de certains axones, suite à la dégénérescence des oligodendrocytes. Ce phénomène compromet la transmission normale rapide (saltatoire) de l'influx nerveux dans le SNC et peut causer des symptômes neurologiques graves. Ce sont les cellules immunitaires, plus particulièrement les lymphocytes T et B, ainsi que les macrophages, qui attaquent la myéline des oligodendrocytes, et causent la dégénérescence de ces derniers. L'infiltration leucocytaire massive entraîne également l'augmentation locale de facteurs pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, MMP, etc.), ce qui contribue au maintien d'un environnement proinflammatoire et aux dommages cellulaires et tissulaires irréparables qui surviennent au sein du foyer périvasculaire de démyélinisation.

Les événements exogènes ou endogènes qui entraînent l'activation du système immunitaire sont pour l'instant nébuleux. L'ordre dans lequel se produisent les événements qui causent la démyélinisation reste encore à élucider, et permettra sans doute de clarifier, du moins en partie, l'étiologie de la SEP. Cependant, il est clair que la modification de la perméabilité de la BHE survient très tôt dans la formation des lésions. D'un point de vue immunitaire, l'attaque inflammatoire semble cibler des épitopes des protéines spécifiques de la myéline, tels que MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), PLP (*proteolipid protein*), MBP (*myelin basic protein*) ou MAG (*myelin associated glycoprotein*)<sup>116</sup>, ce qui convainc plusieurs du caractère auto-immun de cette maladie.

La SEP a une présentation cliniquement hautement hétérogène, ce qui la rend difficile à diagnostiquer. La variabilité des symptômes dépend en effet de la localisation des foyers de démyélinisation, qui peuvent être disséminés dans différentes régions cérébrales<sup>117</sup>. La maladie se présente également sous différentes formes. La forme la plus courante (plus de 80 % des cas) comporte des épisodes pendant lesquels le patient éprouve des symptômes neurologiques, généralement une perte de sensibilité dans les membres, de motricité ou de vision, qui sont suivis de périodes de rémission laissant peu ou pas de séquelles. C'est ce qu'on appelle la forme, cyclique ou de poussées-rémissions (*relapsing remitting*)<sup>118</sup>. Une bonne proportion des cas se présentant d'abord sous cette forme cyclique évolue après quelques épisodes vers une forme secondaire progressive, où on constate une progression insidieuse constante des déficits neurologiques. Il est important de noter qu'une composante neurodégénérative progressive subclinique est probablement présente chez une majorité de

patients dès le début de la maladie, bien que celle-ci ne cause pas toujours des symptômes francs. Environ 15 % des cas de SEP montrent d'emblée une aggravation continue des symptômes sans poussée ni rémission; on parle alors de SEP primaire progressive<sup>119</sup>.

## **2.5 Traitement de la sclérose en plaques**

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour la SEP. La thérapie offerte aux patients atteints de SEP est basée sur l'utilisation d'agents immuno-modulateurs, comme c'est le cas pour la majorité des maladies auto-immunes. L'administration de glucocorticoïdes vise à diminuer la sévérité des poussées, tandis que des traitements plus spécifiques et de plus longue haleine tentent de freiner les poussées et éventuellement la progression globale de la maladie<sup>120</sup>.

Les premiers traitements immuno-modulateurs à avoir été développés pour la SEP sont encore très utilisés aujourd'hui. Il s'agit de l'IFN- $\beta$  et de l'acétate de glatiramer (GA). Bien que les mécanismes d'action de ces molécules ne soient pas parfaitement élucidés, l'IFN- $\beta$  et le GA ont un impact significatif sur l'apparition de nouvelles lésions dans le SNC ainsi que sur la fréquence et la sévérité des poussées dans la forme cyclique de la maladie. L'IFN- $\beta$  semble même avoir une influence directe sur la stabilité de la BHE<sup>121</sup>.

La recherche en SEP a ciblé récemment les CAM pour le développement de nouvelles thérapies, dans le but de réduire la migration transendothéliale des leucocytes à travers la BHE afin de limiter la formation de lésions démyélinisantes. Un anticorps bloquant spécifiquement l'intégrine VLA-4, le Natalizumab ou Tysabri®, a été commercialisé. Les études cliniques ont montré que le Natalizumab permettait une diminution marquée de la fréquence des poussées et de la gravité des symptômes qui accompagnaient ces dernières dans les cas de SEP cyclique<sup>122, 123</sup>. Cependant, certains patients ont développé une leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) suite à la réactivation du virus John Cunningham (JC) dans le SNC. Ce virus, présent de façon asymptomatique dans une grande proportion de la population, est habituellement contrôlé par la surveillance immunitaire, et ne pose problème que chez les patients immuno-supprimés. L'attaque du virus JC pouvant être mortelle, le traitement au Natalizumab est arrêté chez les patients diagnostiqués avec une LEMP, afin de permettre au système immunitaire de combattre l'infection. Il peut alors survenir une aggravation des

symptômes neurologiques, causée par l'entrée massive de leucocytes dans le SNC, qu'on désigne sous le nom de syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire<sup>124</sup>.

Le Natalizumab est toujours utilisé dans le traitement de la SEP. Cependant, compte tenu de ses répercussions sur la surveillance immunitaire, il n'est généralement administré que dans des cas graves de SEP cyclique, où les traitements de première ligne (IFN- $\beta$  et GA) sont inefficaces<sup>125</sup>. D'autres thérapies visant à altérer les capacités transmigratoires des leucocytes, ont récemment été approuvées, telles que le Fingolimod (FTY720 ou Gilenya©). Ce médicament cible les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate afin de séquestrer les leucocytes dans les organes lymphoïdes secondaires<sup>126</sup>. Une autre molécule, le Rituximab (Rituxan© ou MabThera©), est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 qui permet de réduire la population de lymphocytes B<sup>127, 128</sup>. Bien que ces nouvelles thérapies montrent des résultats prometteurs, de nouvelles molécules sont sans cesse ciblées pour le développement d'une plus grande variété de traitements pour la SEP.

Le problème du Natalizumab repose dans l'ubiquité de sa cible, l'intégrine VLA-4, qui est impliquée dans la migration transendothéliale de la majorité des leucocytes. Cependant, plusieurs molécules impliquées dans l'extravasation de populations leucocytaires spécifiques ont été caractérisées dans les dernières années. De nouvelles CAM récemment caractérisées interviennent dans la migration transendothéliale de différentes familles de leucocytes. Attardons-nous un instant sur deux d'entre elles : MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*, ou CD146) et ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule* ou CD166), deux molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines.

MCAM est exprimée par les CE, ainsi que par une sous-population de lymphocytes T CD4+<sup>129, 130</sup>. Identifiée tout d'abord dans certains processus néoplasiques (croissance tumorale, métastases, activité de certaines MMP)<sup>131, 132</sup>, son rôle spécifique dans la migration transendothéliale des cellules T CD4+ proinflammatoires (cellules T<sub>H</sub>17, produisant de l'IL-17, de l'IFN $\gamma$  et du GM-CSF) a été identifié récemment<sup>133</sup>.

ALCAM quant à elle a tout d'abord été identifiée pour son rôle dans l'activation leucocytaire à la synapse immunitaire, via l'interaction avec CD6<sup>134</sup>. Cette molécule est également impliquée dans certains processus de migration cellulaire, notamment lors du développement du SNC<sup>135</sup>. ALCAM est exprimée par les CE-BHE, et peut former des liaisons

homo- ou hétérotypiques avec certaines populations de leucocytes (lymphocytes T CD4+ et monocytes). L'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre ALCAM permet de diminuer la migration transendothéliale de ces cellules immunitaires, et semble efficace dans des modèles *in vivo* et *in vitro* de SEP<sup>136</sup>.

Ces deux molécules présentent un potentiel thérapeutique intéressant pour le traitement de la SEP, puisqu'elles sont impliquées dans le recrutement de populations leucocytaires spécifiques directement liées à la physiopathologie de la maladie. Comme MCAM et ALCAM n'interagissent pas avec tous les leucocytes, bloquer leur action ne devrait pas interrompre la surveillance immunitaire au sein du SNC.



### **3. La sclérose en plaques et son modèle expérimental, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale**

Le développement de médicaments comme le Natalizumab, et l'étude de MCAM, d'ALCAM et de plusieurs autres molécules liées à la SEP ne pourrait être possible sans un éventail de modèles expérimentaux. Certains modèles *in vitro* permettent de reproduire des caractéristiques cibles de la BHE. Il est en effet possible de faire pousser les CE-BHE en une monocouche cellulaire. Ces cellules peuvent ensuite être utilisées pour différentes expériences, comme la mesure de la résistance électrique transendothéliale, ou même l'extravasation leucocytaire, grâce au modèle des chambres Boyden<sup>83</sup>. Cependant, une grande partie des données obtenues expérimentalement sur la transmigration leucocytaire vers le SNC, sur la formation de lésions neuroinflammatoires, ainsi que sur l'efficacité de différents traitements, provient du modèle *in vivo* animal de la SEP, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, ou EAE.

#### **3.1 Encéphalomyélite auto-immune expérimentale**

L'EAE est un modèle basé sur la stimulation du système immunitaire périphérique avec des protéines exogènes du SNC. Dans les faits, les animaux utilisés (généralement, la souris ou le rat), sont injectés en périphérie avec un peptide de la myéline en présence d'adjuvant, afin de stimuler la réaction inflammatoire et l'activation du système immunitaire. Le peptide exogène est reconnu et internalisé par les CPA professionnelles résidentes au site d'injection. Ces dernières migrent vers les ganglions lymphatiques drainant le site d'injection (en général, les ganglions lymphatiques inguinaux) afin d'activer les lymphocytes T auxiliaires (T<sub>H</sub>) naïfs via le CMH de classe II<sup>137</sup>. Les lymphocytes T autoréactifs activés par le peptide exogène sont par la suite en mesure de gagner le SNC et de reconnaître les molécules homologues présentes de façon endogène au sein du SNC de l'animal. Ils sont alors réactivés par les CPA non-professionnelles présentes dans le SNC (par exemple, les microglies),

subissent une expansion clonale et participent au recrutement et à l'activation de différents types de cellules immunitaires (cellules T effectrices, cellules B, macrophages, etc.)<sup>138</sup>. Ceci déclenche l'attaque qui mène à la perturbation de l'UNV, à l'inflammation du parenchyme cérébral, à la destruction de la gaine de myéline des axones et à la dégénérescence cellulaire des neurones, des oligodendrocytes et des cellules gliales. Tout comme dans la SEP, les animaux atteints d'EAE présentent une distribution spatio-temporelle hétérogène de lésions périvasculaires au sein du SNC, ainsi qu'une quantité importante d'anticorps dans le parenchyme cérébral et le liquide céphalorachidien<sup>139</sup>. Ces phénomènes biologiques se traduisent au niveau clinique par une paralysie progressive, généralement ascendante (depuis la queue, jusqu'aux membres antérieurs)<sup>140</sup>.

L'EAE est largement utilisée dans la recherche sur la SEP, et a permis le développement de trois des principaux traitements actuels de la SEP; le GA, le mitoxantrone et le Natalizumab<sup>141, 142, 143</sup>. Cependant, plusieurs thérapies montrant une efficacité prometteuse en EAE ont présenté des complications inattendues lors du traitement de patients atteints de SEP. Outre le développement de LEMP chez les patients traités au Natalizumab<sup>124</sup>, notons l'échec retentissant du traitement avec le ligand peptidique altéré NBI-5788<sup>144</sup>, ainsi qu'avec l'anti-TNF $\alpha$ <sup>145</sup>, qui ont tous les deux causé une exacerbation des symptômes de SEP chez les patients traités. Ces résultats suggèrent d'appliquer avec prudence les thérapies potentielles identifiées en EAE au traitement de la SEP.

Bien que l'EAE ne soit pas une maladie naturelle, elle a en fait été créée chez l'homme : à la fin du 19<sup>e</sup>, Louis Pasteur mit au point un vaccin contre la rage à partir d'homogénats de moelle épinière provenant de lapins infectés. Certains patients développèrent une paralysie sans lien apparent avec la rage, qui affectait d'abord les membres inférieurs, puis pouvait progresser vers les membres supérieurs<sup>140</sup>. Cette anecdote historique met en lumière la plus grande faiblesse de l'EAE, à savoir que cette maladie, bien que similaire à la SEP sur plusieurs points, n'en est pas la réplique exacte.

L'EAE est un modèle hautement variable. La forme de présentation de la maladie, sa sévérité et les phénomènes immunologiques qui y sont associés peuvent être influencés par l'espèce choisie ainsi que par le protocole d'induction. Les rongeurs (rats et souris) sont les

animaux utilisés le plus couramment dans les études d'EAE, bien que ce modèle existe dans plusieurs autres espèces (le lapin, le mouton, le chien et plusieurs espèces de singes). Les études complétées chez les primates, bien que moins fréquentes, sont particulièrement intéressantes, puisque le SNC des singes est très proche de celui de l'homme.

Chez les rongeurs, la grande diversité de souches commerciales influence de façon importante le développement de l'EAE, et ajoute à la complexité de l'interprétation des résultats obtenus. En effet, l'utilisation de populations murines génétiquement homogènes permet d'obtenir des résultats hautement reproductibles. Malheureusement, la diversité génétique de la population a également une influence notoire sur le développement de maladies auto-immunes telles que la SEP. Il est également important de noter que certaines souches murines sont particulièrement sensibles au développement de l'EAE, alors que d'autres y sont résistantes.

L'incidence de l'EAE dans ces différentes souches est également influencée par le peptide utilisé pour l'immunisation. Par exemple, les souris de souche C57Bl/6 répondent spécifiquement à l'immunisation avec le peptide MOG, tandis que les souris de souche B10 sont sensibles à l'immunisation avec les peptides MOG et MBP. Ces deux types de souris développent une maladie monophasique ou chronique, et sont habituellement utilisées pour des études thérapeutiques ainsi que pour la caractérisation de la contribution de différentes populations de lymphocytes T (cellules T auxiliaires  $T_H1$  et  $T_H17$ , cellules T cytotoxiques et cellules T régulatrices) aux phénomènes pathologiques de l'EAE<sup>146, 147, 148</sup>. Les souris de souche SJL, quant à elles, répondent mieux à l'immunisation avec le peptide PLP, et présentent une forme d'EAE semblable à la SEP cyclique. Elles sont particulièrement utiles pour l'étude des mécanismes qui sous-tendent l'apparition de rémissions et de rechutes dans l'EAE, pour la caractérisation du phénomène d'essaimage antigénique ainsi que pour l'étude de la contribution des anticorps et des lymphocytes B dans la physiopathologie de l'EAE<sup>149, 150, 151</sup>.

Il est enfin important de souligner que les mâles sont beaucoup moins fréquemment utilisés que les femelles dans les expériences d'EAE. La grande variabilité dans le développement de l'EAE en fonction de l'espèce et du protocole d'immunisation utilisé contribue à la difficulté d'application des résultats en SEP, puisque tous ces modèles présentent différents aspects de la maladie humaine, sans arriver à les réunir en entier<sup>140</sup>.

Au niveau pathologique, la majorité de l'infiltration leucocytaire se retrouve généralement dans la moelle épinière, ce qui explique la paralysie ascendante développée par la plupart des animaux atteints d'EAE. Ceci constitue une différence majeure avec la SEP, lors de laquelle la matière blanche cérébrale, et dans une moindre mesure, le cortex et le tronc cérébral, sont habituellement principalement touchés par les lésions.

La différence la plus importante entre la SEP et l'EAE réside probablement dans le fait que cette dernière n'est pas une maladie spontanée. Le système immunitaire subit une activation artificielle, par l'injection concomitante de peptides de la myéline et de substances hautement inflammatoires (traditionnellement, l'adjuvant complet de Freund, constitué d'une émulsion d'huile minérale et de *Mycobacterium tuberculosis* inactivé, parfois accompagné de toxine pertussique). C'est ce qu'on appelle l'immunisation active. Ce modèle de base est principalement utilisé pour des études thérapeutiques ainsi que pour évaluer l'influence de gènes spécifiques (en utilisant des animaux transgéniques ou déplétés pour une molécule en particulier)<sup>152</sup>.

Afin de réduire l'influence de ces substances exogènes sur le développement de la maladie et sur les phénomènes neuro-immunitaires observés, il existe également une forme dite passive d'immunisation pour induire l'EAE. Dans ce modèle, l'EAE est induite activement dans un groupe d'animaux. Avant l'apparition des symptômes, les animaux sont sacrifiés, et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques inguinaux et rate) sont récoltés, afin d'en extraire les leucocytes. Ces cellules sont ensuite réactivées *in vitro* en présence du peptide immunogène utilisé et de cytokines proinflammatoires (généralement, IL-12, IL-23, TGF- $\beta$ , IL-6), ce qui permet de favoriser l'interaction entre les lymphocytes T et les CPA et qui entraîne l'expansion clonale des cellules auxiliaires<sup>153</sup>. Ces cellules sont purifiées après réactivation afin d'isoler la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ce sont ces derniers qui seront injectés à des animaux naïfs (non immunisés). C'est alors le potentiel autoréactif seul des cellules transférées qui est responsable du développement des symptômes d'EAE<sup>140</sup>. Il est important de noter qu'il existe également des modèles d'induction passive de l'EAE utilisant d'autres populations cellulaires, telles que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>154</sup>. L'utilisation de lignées cellulaires transgéniques exprimant une protéine fluorescente en

conjonction avec ce modèle d'EAE permet d'obtenir des informations en temps réel sur la migration des cellules immunitaires vers le SNC lors de processus neuroinflammatoires. Cependant, la réactivation forcée des cellules immunitaires *in vitro* et le transfert d'un nombre important de cellules effectrices peuvent causer des artéfacts lors de l'interprétation des résultats en altérant artificiellement la réaction inflammatoire<sup>152</sup> : l'importance d'une population spécifique dans le développement de l'EAE peut être exagérée, ou sous-estimée, par la réactivation massive et spécifique d'un seul type cellulaire (lymphocytes T CD4 ou CD8).

Les modèles d'EAE les plus récemment développés tentent de pallier aux faiblesses de l'immunisation forcée (autant active que passive). En effet, la manipulation génétique a permis au cours des dernières années de générer des lignées d'animaux transgéniques développant l'EAE de façon spontanée. Plus particulièrement, l'expression par des souris transgéniques de récepteurs des cellules T (TCR) isolés de clones CD4+ provenant d'animaux immunisés activement permet d'étudier l'influence des interactions spécifiques épitope-TCR dans le développement de la maladie, apportant de nouvelles informations sur la réactivité du système immunitaire dans les maladies neuroimmunes<sup>153</sup>. Il est intéressant de noter que certaines souches transgéniques exprimant un TCR spécifique pour un peptide de la myéline ne développent pas l'EAE<sup>155, 156</sup>. Dans d'autres modèles, l'incidence de l'EAE est faible, et les manifestations cliniques s'apparentent à d'autres pathologies neuroimmunes. C'est le cas de la souris 2D2, qui présente un TCR spécifique pour le peptide MOG<sub>35-55</sub>, et chez laquelle on retrouve seulement 4% de prévalence d'EAE, contre 30% de prévalence de névrite optique<sup>157</sup>. Cette variabilité dans l'incidence de la maladie, malgré la présence de cellules spécifiques autoréactives, rappelle que les mécanismes qui sous-tendent le développement de l'EAE spontanée sont encore nébuleux. Ce phénomène est cependant peu surprenant, puisque des études effectuées chez l'humain montrent la présence de clones autoréactifs à la myéline chez tous les sujets examinés, bien que la plupart d'entre eux ne souffrent pas de maladie auto-immune<sup>158, 159</sup>. Le degré d'activation de ces cellules autoréactives, couplé à la disponibilité du peptide-cible, a cependant un impact significatif sur le déclenchement ou non d'une réaction auto-immune<sup>158</sup>.

Des modèles transgéniques présentant un TCR autoréactif dans la population de cellules T cytotoxiques (CD8+) ont également permis de confirmer le potentiel pathogène de ce sous-type cellulaire pour initier des symptômes d'EAE<sup>154</sup>. Enfin, des souris exprimant un TCR isolé à partir de cellules CD4+ provenant de patients atteints de SEP (ou TCR humanisé) sont également capables de développer l'EAE spontanée, bien que ces modèles présentent généralement une incidence faible de la maladie<sup>160, 161</sup>. Ces différents modèles d'EAE spontanée permettent de contourner partiellement l'activation aberrante que l'on retrouve lors de l'immunisation active ou passive, et présentent une réponse immunitaire principalement médiée par les lymphocytes T. Cependant, la participation active des lymphocytes B dans le développement de la SEP est un domaine d'étude qui suscite de plus en plus d'intérêt<sup>162, 163</sup>. De nouveaux modèles transgéniques d'EAE tentent aujourd'hui d'incorporer la contribution des cellules B dans la physiopathologie de l'EAE spontanée. C'est le cas de la souris OSE, qui présente à la fois un TCR et un anticorps monoclonal spécifiques pour le peptide MOG<sup>164</sup>. Récemment, le groupe du Dr H. Wekerle (Allemagne) a également décrit un modèle d'EAE spontanée impliquant les cellules T et B, chez la souris TCR1640.

### **3.2 Le modèle TCR1640**

La souris TCR1640 possède un TCR (récepteur des cellules T) spécifique pour le peptide de la myéline MOG<sub>92-106</sub>. Ce TCR a été identifié en isolant une cellule CD4+ T<sub>H</sub>1 encéphalitogène après immunisation d'une souris SJL saine avec du MOG recombinant de rat. Il est constitué des chaînes variables V $\alpha$ 8.3 et V $\beta$ 4. Dans le thymus, 99,3% des lymphocytes T CD4+ et 97% des lymphocytes T CD8+ expriment ce TCR<sup>165</sup>. Le modèle TCR1640 présente plusieurs avantages par rapport à l'EAE induite et entraîne une maladie cliniquement et épidémiologiquement beaucoup plus proche de la SEP, par rapport à d'autres modèles transgéniques d'EAE.

Tout d'abord, la maladie est spontanée chez ces souris, et n'a donc pas besoin d'être provoquée. De plus, les proportions de mâles et de femelles qui développent l'EAE, ainsi que la forme de la maladie qui se développe en fonction du sexe, rappellent les données épidémiologiques recueillies dans des cohortes de patients atteints de SEP. Par exemple, la forme poussée-rémission est plus fréquente chez les femelles, alors que les mâles, bien que

malades en moins grand nombre, sont plus souvent atteints d'une forme primaire progressive ou chronique. Les souris ne présentent pas seulement des épisodes de paralysie, mais aussi d'ataxie. La nature des symptômes est directement liée à la localisation des infiltrats leucocytaires (moelle épinière, tronc cérébral et nerf optique pour les souris souffrant de paralysie; cervelet et tronc cérébral pour les souris ataxiques).

L'analyse par cytométrie de flux a permis de montrer que les infiltrats présents au sein du SNC étaient majoritairement composés de lymphocytes T CD4+ et de cellules B, et dans une plus faible proportion de cellules T CD8+. Les cellules T transgéniques des souris TCR1640 semblent permettre la prolifération de cellules B reconnaissant le peptide MOG. Il est intéressant de noter que le peptide reconnu par ces cellules B est différent du peptide cible du TCR transgénique. Le transfert adoptif de cellules B provenant d'animaux TCR permet le développement de la maladie par des souris SJL sauvages (WT)<sup>165</sup>.

La caractérisation officielle du modèle TCR1640 est pour l'instant sommaire, et présente peu de données par rapport aux phénomènes qui surviennent à l'UNV, et de façon plus générale dans le système immunitaire.

# Hypothèse et objectifs

## Hypothèse :

L'hypothèse de ce projet de recherche est que le modèle d'EAE spontanée TCR1640 est un outil de premier choix pour l'étude des phénomènes pathologiques liés à la SEP. Ce modèle, permettant l'apparition de l'EAE sans manipulations expérimentales, permet de caractériser différents aspects des processus neuro-immuns, que ce soit les changements qui surviennent à la BHE, l'activation immunitaire périphérique et cérébrale ou l'étude des CAM.

Afin de valider cette hypothèse, les objectifs suivants ont été fixés :

### 1) Caractérisation *in situ* de la BHE et du parenchyme cérébral des souris TCR1640

L'expression de molécules caractéristiques de la BHE (protéines des JS, CAM), de composantes de l'UNV (astrocytes, microglie) et de cellules immunitaires (lymphocytes T CD4+, macrophages) sera étudiée *in situ* par immunohistofluorescence sur des échantillons du SNC. Ces expériences me permettront d'évaluer le degré de dysfonction de la BHE et la réponse immunitaire qui y est associée dans le modèle d'EAE spontanée.

### 2) Caractérisation du profil immunitaire des souris TCR1640

Les populations leucocytaires peuplant le SNC et les organes lymphoïdes secondaires seront étudiées par cytométrie de flux. Leur niveau d'expression de certaines CAM (VLA-4, MCAM, ALCAM), ainsi que leur production de cytokines proinflammatoires (IFN $\gamma$ , IL-17) seront également analysés, en considérant le score clinique, le sexe et le stade de la maladie. Ces expériences me permettront de corrélérer la dysfonction de la BHE à l'infiltration des leucocytes au cours de l'EAE spontanée.

### 3) Modulation *in vivo* de l'EAE spontanée développée par les souris TCR1640

Le modèle TCR1640 sera utilisé pour évaluer la capacité d'un traitement approuvé pour la SEP à moduler la sévérité clinique et l'évolution de la maladie chez les souris TCR1640 *in vivo*. Ces expériences me permettront de confirmer que l'EAE développée par les souris TCR1640 peut être modulée de façon similaire à la SEP humaine.



# Matériel et méthodes

## 1. Génotypage des animaux

Le modèle d'EAE caractérisé ici est un modèle transgénique hétérozygote. Ces souris ont été obtenues grâce à la collaboration du laboratoire du Dr Hartmut Wekerle (Allemagne). Les animaux sont produits en mettant en couple un mâle TCR1640 hétérozygote et deux femelles SJL (Charles River). Les portées de souriceaux sont donc formées d'animaux WT et transgéniques hétérozygotes. Le génotypage est effectué par PCR (*polymerase chain reaction*) sur de l'ADN provenant d'une biopsie de queue ou d'oreille que l'on récolte lors du sevrage des animaux, à l'âge de quatre semaines.

Le tissu est dénaturé par incubation pendant une nuit (O/N, *overnight*) à 55 °C en présence de protéinase K (Roche #03 115 828 001, 10 µL) dans une solution tampon (10mM Tris-HCl pH = 8.0, 2 nM EDTA, 300 nM NaCl, 0.5% SDS; 500 µL). L'ADN est extrait en ajoutant 500 µL de phénol:chloroforme:alcool isoamyle (25:24:1 v/v, Invitrogen #15593-049), puis en centrifugeant 10 min à 2700 rpm. On ajoute ensuite 500 µL de chloroforme :alcool isoamyle (24 :1 v/v, Fluka #25666), avant de faire une deuxième centrifugation de 10 min à 2700 rpm. L'ajout d'une solution d'acétate de sodium (50 µL de NaOAc pH = 5.2 dans 1 mL d'EtOH pur) permet la précipitation de l'ADN. Après précipitation O/N à -20 °C, le culot d'ADN est récupéré par centrifugation (15 min à 13500 rpm), puis séché à température ambiante (TA) pour quelques heures avant d'être réhydraté dans une solution de Tris-EDTA 1X (trishydroxyméthylaminométhane-acide éthylène diamine tétra-acétique). L'ADN obtenu est ensuite dilué (concentration maximale de 250 ng/mL). L'échantillon est préparé pour le PCR selon la recette suivante :

- 12.5 µL GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega);
- 1µM de chacune des amorces suivantes<sup>165</sup> : pour la chaîne  $\alpha$ , amorce sens = mTCR-V $\alpha$ 8.3-CDR3, 5'-CTCCATAAGAGCAGCAGCTCC-3', amorce anti-sens =  $\beta$ -globine humaine, 5'-CGTCTGTTTCCCATTCTAAACTGTACC-3'; pour la chaîne  $\beta$ , amorce sens = PH-2Kb, 5'-CTGGATATAAAGTCCACGCAGCC-3', amorce anti-sens = TCRV $\beta$ 4-CDR3, 5'-CAATCTCTGCTTTTGATGGCTCAAAC-3';

- 1 µL de la dilution d'ADN obtenue (maximum 250 ng);
- Eau exempte de nucléases pour compléter le volume à 25 µL

Le PCR est effectué avec un thermocycleur, en faisant une première incubation de 5 min à 94°C, puis 34 fois le cycle suivant : 45 sec à 94°C; 45 sec à 58°C; 1 min à 72°C. Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel d'agarose (1,2 %) dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X contenant du bromure d'éthidium (5 µL/100 mL de tampon), et migrent pour 1 h à 82 V avant d'être analysés sous lampe UV (voir **figure S1** en annexe pour exemple de résultat).

## 2. Observations cliniques

Afin d'effectuer la caractérisation de ce nouveau modèle, les souris sont observées deux fois par semaine à partir de l'âge de 35 jours. Lors de l'apparition des premiers symptômes, les animaux sont observés cinq fois par semaine afin d'assurer la précision dans le classement des scores cliniques. L'échelle de score clinique (paralysie) classique d'EAE a été adaptée pour le modèle TCR1640 (voir **tableau 1**).

**Tableau 1 : Échelle de score clinique (paralysie)**

Score clinique	Symptômes
0	en santé
0.5	½ queue flaccide (faible)
1	queue flaccide
1.5	queue flaccide + démarche altérée (plus lente)
2	faiblesse légère des MP (diminution de l'amplitude du mouvement, affaissement des hanches)
2.5	faiblesse légère des MP + altération du réflexe de redressement (RR)
3	faiblesse prononcée d'au moins 1 MP, boiterie
3.5	faiblesse prononcée des 2 MP ou paralysie d'1 MP
4	paralysie des 2 MP
4.5	paralysie des 2 MP + faiblesse des MA
5	état moribond

Légende : MP = membres postérieurs; MA = membres antérieurs.

Dans les expériences présentées ici, les souris TCR1640 ont été classées en trois groupes expérimentaux selon leur stade de maladie : animaux présymptomatiques, animaux en phase aiguë et animaux en phase chronique d'EAE spontanée. Les animaux présymptomatiques sont âgés de 35 jours. Les animaux en phase aiguë sont âgés de 60 à 90 jours, et ont atteint pour la première fois un score clinique de 3.5 ou plus dans les quatre jours précédant le sacrifice. Les animaux en phase chronique sont âgés de plus de 80 jours, sont malades depuis plus de trois semaines et ont un score clinique stable depuis plus de 10 jours. Les animaux contrôles (WT) utilisés sont issus de la même portée que les souris TCR, et ont donc toujours le même âge que ces dernières. Lors de la sélection des animaux malades en phase aiguë d'EAE, il est impossible de garantir la forme de la maladie que l'animal développera (cyclique ou progressive). Cependant, il est important de rappeler que la majorité des femelles TCR développeront une forme cyclique d'EAE. Néanmoins, l'objectif de cette étude n'est pas de comparer la physiopathologie de l'EAE cyclique à celle de l'EAE progressive, mais bien de tenter de mettre en lumière des caractéristiques différentes présentes chez des animaux malades depuis peu par rapport à des animaux en phase chronique d'EAE.

### **3. Prélèvement d'organes et conservation**

Pour prélever les tissus nécessaires aux différentes expériences, les souris sont anesthésiées avec une dose létale de pentobarbital (Euthanyl™) et perfusées de façon intracardiaque avec 25 mL de tampon PBS (*phosphate buffered saline*) 1X froid afin de nettoyer les organes du sang qu'ils contiennent.

Les organes destinés à l'imagerie (cerveau, moelle épinière) sont recueillis dans un moule contenant de l'O.C.T.™ (*Optimal Cutting Temperature*, TissueTek) et congelés à -80 °C pour utilisation ultérieure (voir **section 4**).

Les organes destinés à l'isolation de leucocytes (ganglions lymphatiques inguinaux, rate, cerveau et moelle épinière) sont recueillis dans des tubes contenant le milieu de culture RPMI 1640 (Wisent) et utilisés immédiatement (voir **section 7**).

#### **4. Préparation du tissu murin et des lames**

Les sections de tissu utilisées pour l'immunohistofluorescence et la coloration de la myéline sont préparées à l'aide d'un cryostat Leica CM3050S (Leica Microsystems). Des sections de 7µm sont coupées à -23 °C et récoltées sur des lames de verre (Surgipath Micro slides Snowcoat X-tra™, Leica Biosystems). Les lames sont séchées à l'air ambiant pour au moins cinq heures, puis le tissu est fixé par immersion dans l'acétone pur pendant 20 sec. Les lames sont conservées à -80 °C pour utilisation ultérieure (voir **sections 5 et 6**).

#### **5. Coloration de la myéline**

La coloration au Luxol Fast Blue, à l'hématoxyline et à l'éosine (LFB/H&E) est utilisée afin d'évaluer la démyélinisation au sein des lésions du SNC. Les sections décongelées sont d'abord fixées dans une solution de formaldéhyde 10 % pendant 45 min à TA. Après un lavage de 3 min au PBS 1X, les sections sont incubées O/N à 60 °C dans une solution de Luxol Fast Blue(5 g de Solvan Blue 38 – Sigma #S3382, 500 mL d'EtOH 95%, 0,25 mL d'acide acétique glacial). La coloration est ensuite différenciée en trempant brièvement les sections dans une solution réductrice (1 g hydroquinone, 5 g sulfite de sodium, 100 mL d'eau distillée), puis en effectuant des lavages sous l'eau courante. La coloration nucléaire est obtenue en incubant les sections en présence d'hématoxyline (Harris Hematoxylin Solution, Sigma # HHS16) à TA pendant 10 min, puis différenciée en trempant les sections dans une solution d'alcool acide (1% d'acide acétique dans l'EtOH 70%). Les sections sont exposées à une solution basique (NaOH 0,05 % dans l'eau), puis déshydratées par incubation dans une solution d'alcool (EtOH 95 %), avant d'être exposées à l'éosine Y (100 mL éosine Y – Sigma #230251, 50 mL acide acétique glacial, 450 mL EtOH 80%) pendant 90 sec afin d'obtenir la coloration rosée des corps cellulaires. Après un lavage de 3 min dans l'EtOH 95%, les sections sont déshydratées pour 4 min dans l'EtOH 100%, puis plongées dans du toluène 100%, afin d'assurer la déshydratation complète des sections. Les lames sont ensuite montées avec le milieu Entellan (Merck), puis séchées. L'acquisition d'images a été effectuée avec un microscope Leica BM6000 (Leica), en utilisant le logiciel OpenLab 4.0.4 (PerkinElmer).

## **6. Immunohistofluorescence et microscopie confocale**

Les sections de tissu décongelées sont fixées à l'acétone pur (-20 °C) pendant 10 min, puis incubées dans l'éthanol 70 %(-20 °C) pendant 5 min.

Les sections sont isolées les unes des autres (Dako PEN, Dako), puis recouvertes de sérum d'âne 10 % pendant 30 min, afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques des anticorps utilisés. Après cette incubation, les sections sont exposées O/N (4 °C) à l'anticorps dirigé contre la molécule d'intérêt (voir **Tableau S1** en annexe), dilué dans du sérum d'âne 3 %. Pour les anticorps étant déjà couplés à un fluorochrome, toutes les incubations ainsi que les lavages sont faits à l'abri de la lumière, afin de préserver l'excitabilité du fluorochrome.

Sept lavages de 3 min au PBS Tween20 0,05 % (Sigma #P1379) sont effectués, avant d'incuber les sections à température ambiante pendant 45 min en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (voir **Tableau S1** en annexe). Après une nouvelle série de lavages au PBS Tween20, la perméabilité des noyaux est augmentée grâce à une incubation de 10 min en présence du détergent Triton X-100 1 % (Sigma #T9284). Les lames sont ensuite montées avec un milieu (Mowiol, CalBiochem) contenant le colorant nucléaire Topro3 (1:300, Life Technologies). Elles sont conservées pour analyse à 4 °C à l'abri de la lumière afin de préserver la réactivité des fluorochromes.

L'acquisition des images a été effectuée avec un microscope confocal (LEICA SP5, Leica), en utilisant le logiciel LAS AF (Leica).

## **7. Isolation de leucocytes**

L'isolation des leucocytes doit être effectuée sur des échantillons frais. Les organes sont récoltés dans du RPMI, puis écrasés à l'aide d'un piston de seringue à travers un filtre (pores de 70 µm, BD Biosciences) afin de libérer les cellules immunitaires des éléments fibreux du parenchyme. Selon l'organe utilisé, l'obtention des cellules immunitaires se fait en différentes étapes :

### **Ganglions lymphatiques inguinaux :**

Après lavage du filtre et centrifugation (10 min à 1200 rpm), les cellules sont resuspendues dans du RPMI complet (RPMI1640™ contenant 10 % FBS – *Fetal Bovine Serum*). L'échantillon est prêt pour décompte cellulaire.

### **Rate :**

Après lavage du filtre et centrifugation (10 min à 1200 rpm), le culot de cellules est incubé dans une solution de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) 0,83 % (3 min à TA) afin de permettre la lyse des globules rouges. La réaction est stoppée en ajoutant du RPMI™ puis en centrifugeant (10 min à 1200 rpm). L'échantillon est ensuite filtré pour se débarrasser du tissu conjonctif présent dans la rate. Après une nouvelle centrifugation (10 min à 1200 rpm), les cellules sont resuspendues dans du RPMI complet et prêtes pour décompte cellulaire.

### **Système nerveux central :**

Après lavage du filtre et centrifugation (10 min à 1500 rpm), le culot de cellules est soumis à un gradient de Percoll™ (0-40-60-90 %) (GE Amersham) afin de séparer myéline, cellules immunitaires et globules rouges. Après centrifugation (10 min à 1500 rpm, en assurant une accélération et un freinage lents), les leucocytes sont récoltés à l'interface 40 %-60 % à l'aide d'une pipette en plastique, transférés dans un nouveau tube, lavés avec du HBSS 1X (Wisent), puis centrifugés (10 min à 1500 rpm). Après un lavage subséquent dans du RPMI complet (puis centrifugation 10 min à 1500 rpm), le culot de cellules est resuspendu dans du RPMI complet et prêt pour décompte cellulaire.

## **8. Immunomarquage des leucocytes et cytométrie de flux**

Suite au décompte cellulaire (effectué à l'aide d'un hémacytomètre et une coloration au bleu de Trypan d'une partie des cellules récoltées), les cellules en provenance des différents organes sont transférées dans une plaque de 96 puits. On récolte 100 000 cellules par échantillon pour un marquage uniquement extracellulaire (qui sera effectué immédiatement), tandis qu'on récolte 200 000-1 000 000 cellules pour un marquage intracellulaire. Dans ce dernier cas, les cellules seront stimulées O/N (pendant la nuit, *overnight*) en présence de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (20 ng/mL), d'ionomycine (1 µg/mL) et de brefeldine A (2

µg/mL). Bien qu'une stimulation plus courte soit généralement utilisée dans la littérature (4-6h)<sup>100</sup>, la stimulation O/N a été choisie pour cette étude car elle facilite les manipulations expérimentales. Bien qu'un temps de stimulation plus long puisse engendrer des différences au niveau de l'activation des cellules (données non présentées), tous les échantillons utilisés ici ont été traités selon le même protocole expérimental, et présentent donc des résultats homogènes.

Après stimulation O/N, les cellules sont transférées dans une plaque de 96 puits «V-bottom», puis centrifugées (7 min à 1600 rpm) pour arrêter la réaction. Elles sont ensuite resuspendues dans une solution tampon pour la cytométrie (PBS 1X contenant 1 % de FBS et 0,1 % d'azide de sodium). Après 10 min d'incubation à 4 °C avec l'anticorps bloquant anti-CD16-CD32 (1:50, BD Pharmingen #553142) afin de minimiser les interactions non spécifiques des anticorps, les cellules sont incubées 30 min à 4 °C avec un cocktail d'anticorps pour marquage extracellulaire (voir **Tableau S2** en annexe), puis centrifugées 7 min à 1600 rpm. Deux lavages au tampon de cytométrie sont effectués, suivis de centrifugations. Les échantillons destinés à un marquage intracellulaire sont ensuite perméabilisés avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) et de saponine (58 mL HBSS 1X, 40 mL PFA 10%, 1 mL HEPES 1M, 1 mL saponine 10%). Après centrifugation et lavage avec une solution tampon contenant de la saponine (0.1 % saponine dans la solution tampon pour la cytométrie), les cellules sont incubées pour 30 min à 4 °C avec le cocktail d'anticorps pour le marquage intracellulaire (voir **Tableau S2** en annexe). Après deux lavages subséquents dans le tampon saponine, les échantillons marqués pour le facteur de transcription FoxP3 sont ensuite traités pour une perméabilisation nucléaire avec des solutions commerciales et selon le protocole fourni (PE anti-human FoxP3 staining set, eBioscience #72-5774-40). Les cellules seront cependant marquées avec l'anticorps anti-FoxP3 murin (eBioscience #12-5773). Après lavage, les cellules seront resuspendues dans le tampon pour la cytométrie, puis transférées dans des tubes de cytomètre.

L'acquisition des données a été faite par cytométrie de flux sur un cytomètre BD LSR II, à l'aide du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences).

## **9. Transfert adoptif de lymphocytes CD4+ et traitement avec l'anticorps bloquant anti VLA-4 :**

Des splénocytes en provenance de souris TCR1640 présymptomatiques âgées de 38 à 42 jours sont récoltés, purifiés (voir **section 7**) et mis en culture (concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/mL) pour quatre jours avec 1  $\mu\text{g/mL}$  d'anticorps anti-CD3 murin et le cocktail de cytokines recombinantes suivant : IL-12 murin (3 ng/mL), IL-23 murin (20 ng/mL), TGF $\beta$  humain (4 ng/mL), IL-6 murin (20 ng/mL). Les lymphocytes T CD4 + sont ensuite purifiés par sélection négative en incubant les cellules avec un cocktail d'anticorps couplé à des billes magnétiques (kit II d'isolation de cellules T CD4+, Miltenyi Biotec), puis en les faisant traverser une colonne aimantée (colonne MACS, Miltenyi Biotec).

Une portion de ces cellules est réservée pour immunomarquage extra- et intracellulaire (voir **section 8**). Les cellules restantes sont injectées par voie i.p. dans des souris receveuses WT âgées de 40 à 70 jours ( $8.0 \times 10^6$  cellules/souris). Les souris sont ensuite traitées tous les deux jours (à partir du jour 2 post-immunisation) avec une injection i.p. de 75  $\mu\text{g}$  d'anticorps bloquant anti-VLA-4 (BD Biosciences) ou de 200  $\mu\text{L}$  de PBS, et observées de façon quotidienne pour l'attribution du score clinique et la pesée.

## **10. Analyse et tests statistiques**

GraphPad Prism 4® a été utilisé pour compiler les données et effectuer les analyses statistiques, qui incluent des analyses de variance par ANOVA (figures 7 à 14) ou des tests de Student non appariés pour comparer deux groupes expérimentaux (figure 17). Les valeurs sont significatives pour  $p < 0.05$ .



# Résultats

## 1. Caractérisation clinique

Avant d'entreprendre l'étude de molécules spécifiques, les souris de la colonie TCR1640 ont été observées de façon quotidienne pendant plusieurs mois (jusqu'à l'âge d'environ 160 j), afin que notre équipe de recherche puisse se familiariser avec ce modèle, dont la caractérisation clinique diffère un peu de l'EAE classique. C'est également lors de cette période que les tissus qui ont servi aux expériences d'IHF ont été récoltés. Des données épidémiologiques ont été recueillies, afin de comparer les résultats obtenus dans notre colonie avec les informations publiées à propos du modèle TCR1640<sup>165</sup>. Dans notre colonie TCR1640, la prévalence de la maladie à 160 j, c'est-à-dire le pourcentage de souris ayant développé des symptômes d'EAE, est de 81 % chez les femelles, et de 47 % chez les mâles (**figure 1A**). L'incidence de la maladie, c'est-à-dire le pourcentage de nouveaux cas dans la population totale pour une période donnée, atteint son maximum à l'âge d'environ 60 j chez les femelles. Chez les mâles, l'incidence maximale de l'EAE se situe plutôt vers l'âge de 75 j (**figure 1B**). Les premiers symptômes cliniques peuvent apparaître, chez les mâles comme chez les femelles, vers l'âge de 45 jours (**figure 1 B**).

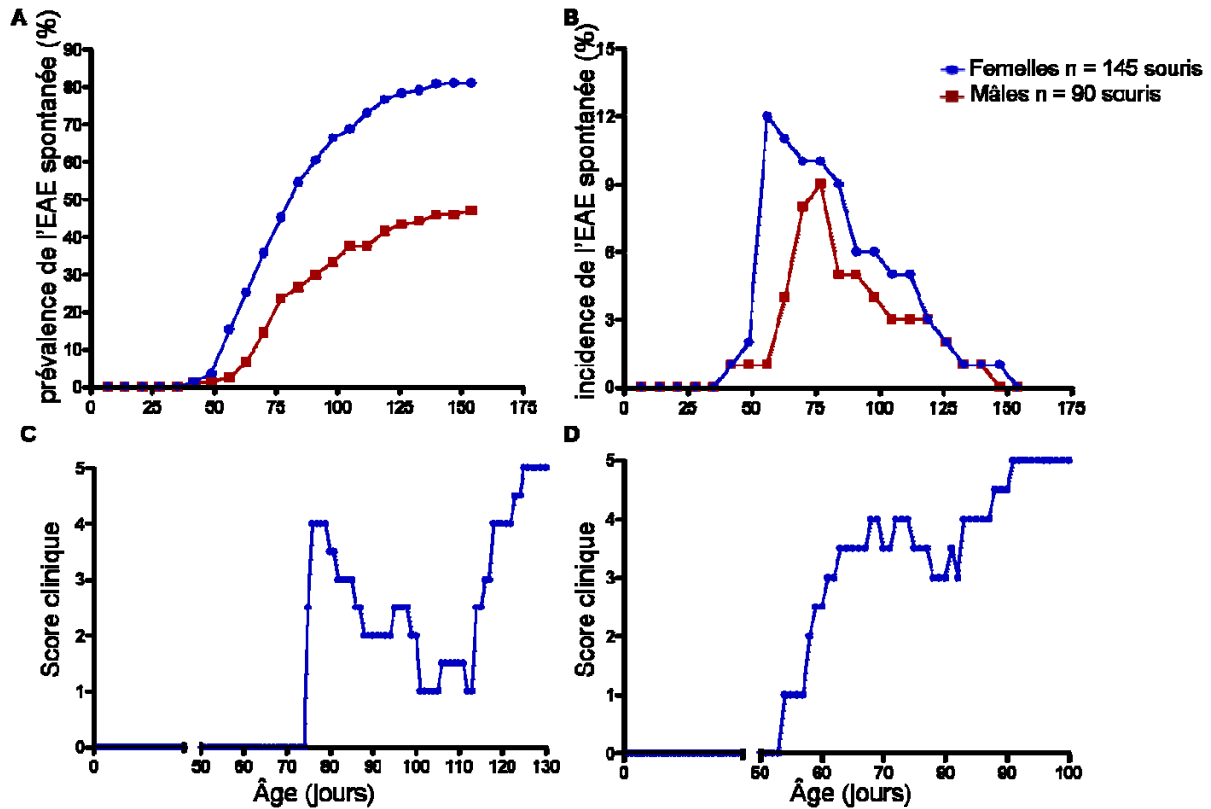
Ces observations ont également mené à l'identification de deux formes principales d'EAE, la forme cyclique et la forme progressive. La forme cyclique est la plus courante, et se caractérise par différents épisodes de paralysie ou d'ataxie, entrecoupés de périodes significatives de rémission clinique (**figure 1C**). La forme progressive, quant à elle, peut présenter quelques fluctuations dans l'évolution des symptômes, mais est dépourvue de phases claires de rémission (**figure 1D**). Les souris peuvent également présenter des symptômes stables (sans aggravation apparente) pour une période de temps pouvant s'étendre sur plusieurs semaines. Généralement, les souris présentent d'abord deux ou trois épisodes entrecoupés de rémissions, puis montrent une stabilisation de leurs symptômes ou une progression continue. Chez les mâles, la présentation initiale de la maladie sous forme progressive est la plus fréquente (données non présentées).

Ce sont ces observations qui ont permis d'identifier les différents stades cliniques étudiés ci-après : les souris sont considérées présymptomatiques jusqu'à l'âge de 45 jours, puisqu'on n'observe pas de cas d'EAE avant cet âge. Cependant, l'apparition de symptômes supposant une mise en place préalable de phénomènes pathologiques subcliniques, les souris présymptomatiques utilisées pour cette étude sont âgées de 35 j. Les souris catégorisées en phase aiguë doivent présenter un score clinique sévère (supérieur à 3.5, c'est-à-dire une paralysie complète des membres postérieurs), mais n'être atteintes que depuis une courte période (moins d'une semaine). Enfin, les souris en phase chronique peuvent avoir présenté ou non des épisodes cycliques d'EAE, mais doivent avoir un score clinique sévère (supérieur à 3.0, c'est-à-dire une parésie des membres postérieurs) depuis plus de trois semaines.

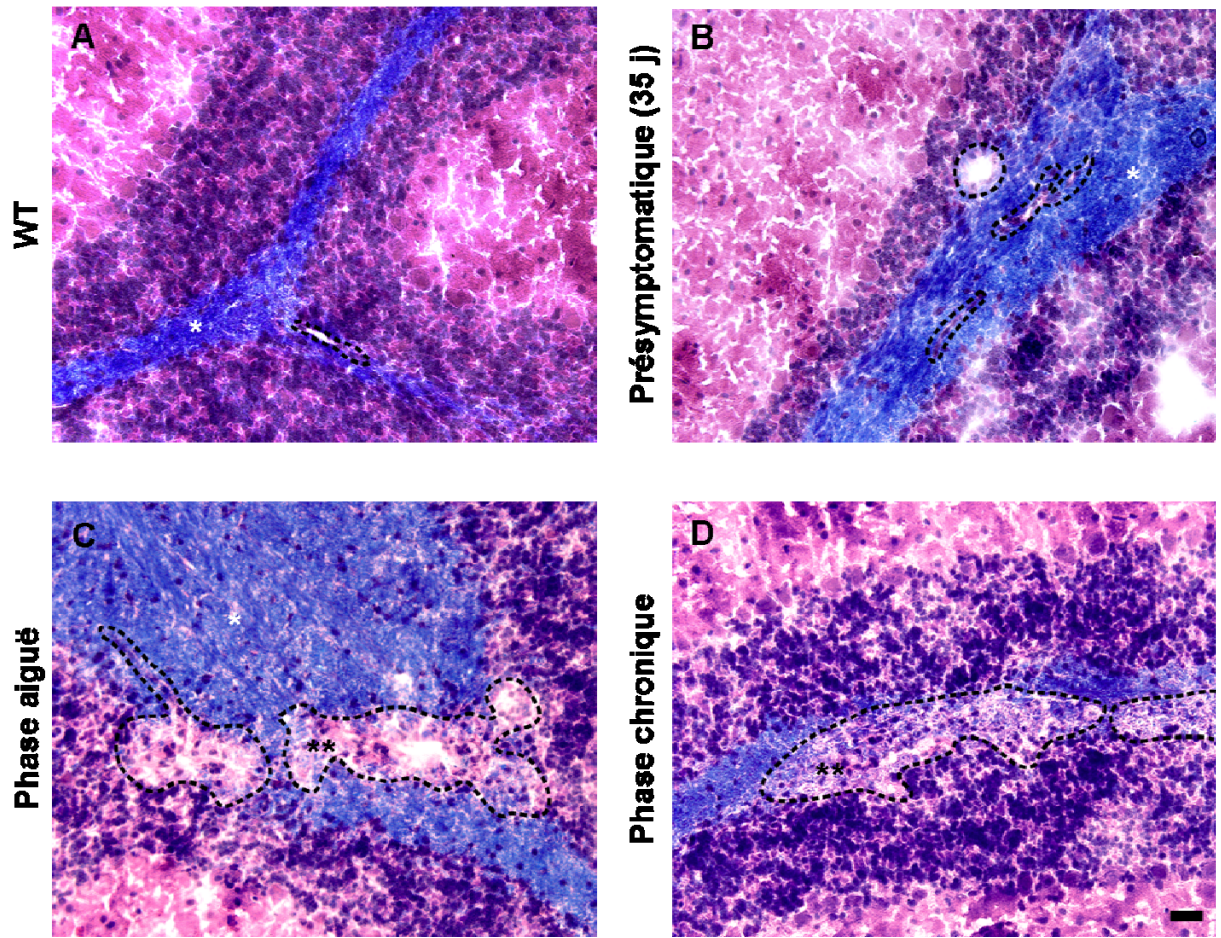
## 2. Inflammation au sein de l'UNV

Toutes les images présentées ici ont été prises dans la matière blanche du cervelet. Cependant, la moelle épinière est la région la plus gravement atteinte lors de l'EAE spontanée. L'étendue des phénomènes pathologiques qu'on y retrouve est telle qu'il est difficile d'associer des phénomènes particuliers au stade de la maladie observé (données non présentées). Le cervelet, dans lequel l'infiltration est plus modeste, présente des modifications plus subtiles dans les différentes phases de la maladie observée chez les animaux TCR1640. Cette région a donc été choisie pour l'analyse *in situ*. D'autres régions du parenchyme cérébral, ainsi que les méninges, ont également été observées afin d'assurer que les résultats présentés ici soient représentatifs de l'état général du SNC.

Après avoir déterminé les différents stades à étudier, la coloration de la myéline par LFB/H&E<sup>166</sup> nous a permis d'effectuer la première observation *in situ* (**figure 2**). À première vue, il ne semble pas y avoir de différence dans le parenchyme cérébelleux entre les animaux WT (**figure 2A**) et les animaux TCR1640 durant la période présymptomatique (**figure 2B**). On remarque cependant l'apparition de plaques de démyélinisation périvasculaires focales dans la phase active de l'EAE spontanée (**figure 2C**). Ce phénomène semble s'aggraver lors de la phase chronique (**figure 2D**), où l'on note une plus grande étendue de la démyélinisation périvasculaire.



**Figure 1. Caractérisation clinique de l'EAE spontanée dans la colonie TCR1640.** L'observation des animaux TCR1640 a permis de recueillir des données épidémiologiques afin de comparer la prévalence (A) et l'incidence (B) de l'EAE spontanée chez les mâles (en rouge, n = 90 souris) et les femelles (en bleu, n = 145 souris) dans cette colonie. Un exemple de la forme cyclique de l'EAE spontanée est présenté en (C), et un exemple de la forme progressive est présenté en (D).

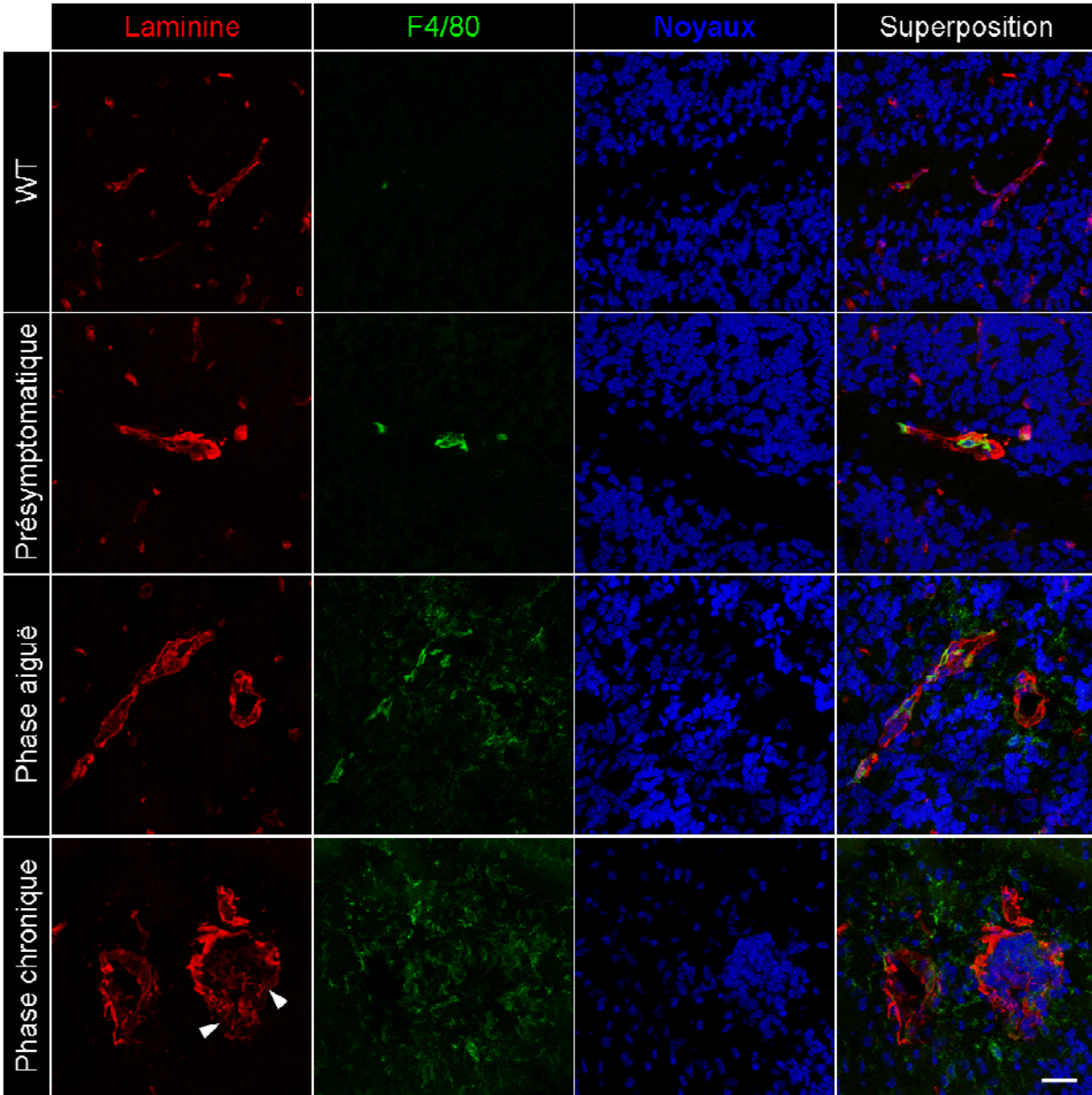


**Figure 2. Coloration au LFB/H&E à différents stades d'EAE spontanée.** La coloration au Luxol Fast Blue, à l'hématoxyline et à l'éosine (LFB/H&E) permet de mettre en évidence la démyélinisation focale périvasculaire qui apparaît dans la matière blanche du cervelet aux stades aigu (C) et chronique (D) de l'EAE spontanée. La ligne pointillée délimite les vaisseaux sanguins non altérés chez les animaux WT (A) ou TCR1640 au stade présymptomatique (B), ou la région périvasculaire démyélinisée (qui perd sa coloration bleutée) aux stades aigu (C) et chronique (D). Légende : \* = coloration au Luxol Fast Blue; \*\* = perte de la coloration au Luxol Fast Blue. n = 3 animaux par groupe; échelle = 20  $\mu$ m.

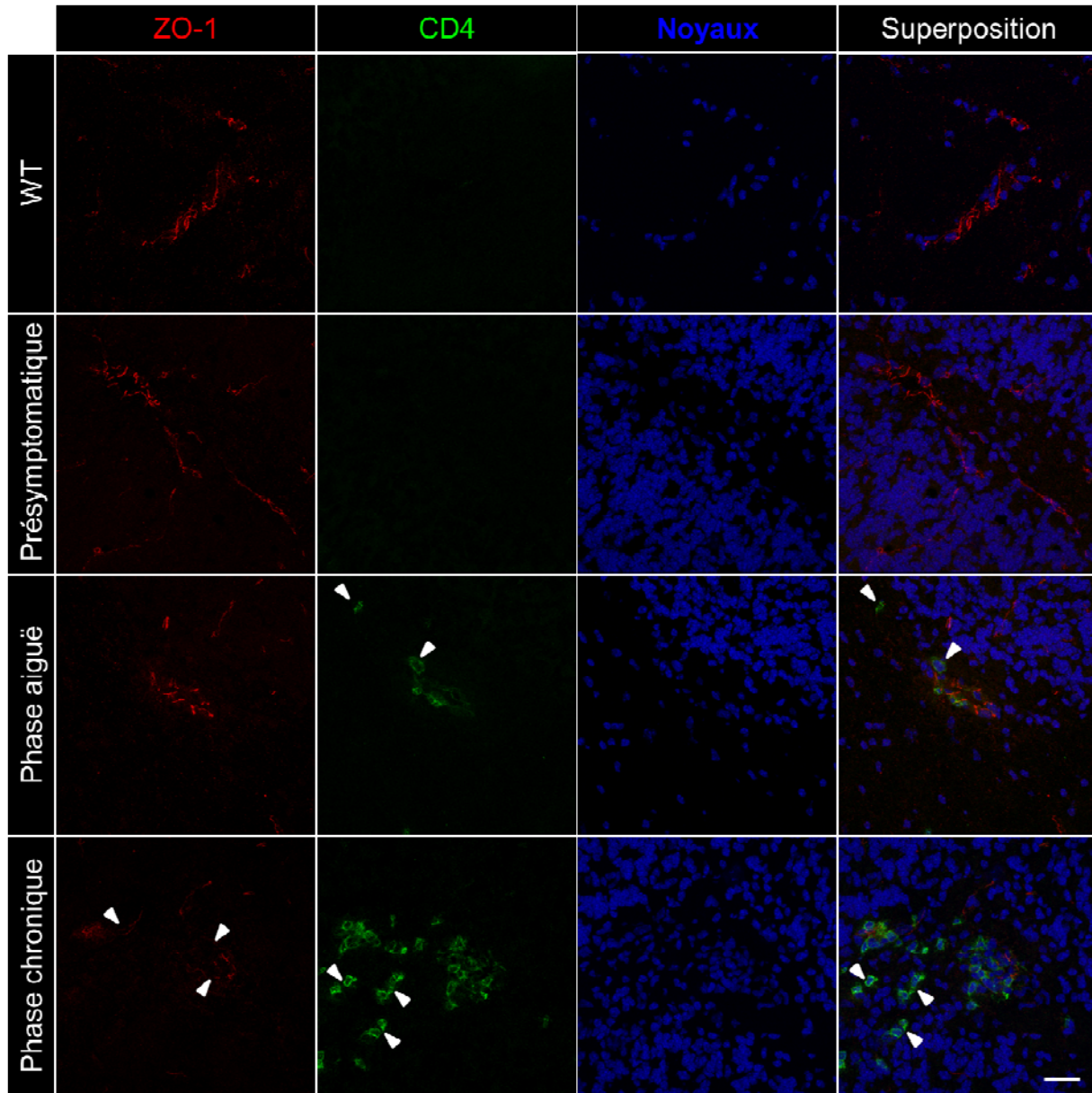
Après avoir constaté la présence de plaques focales de démyélinisation à différents stades de la maladie chez les animaux TCR1640, l'analyse par IHF nous a permis de mieux caractériser l'intégrité de la BHE et les phénomènes immunitaires qui y sont associés dans ce modèle d'EAE spontanée.

La molécule F4/80, analogue murin de la protéine humaine EMR1 (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*), est exprimée par les macrophages et la microglie activés<sup>167</sup>. L'immunomarquage de F4/80 révèle la présence accrue de macrophages périvasculaires dans les souris TCR1640 par rapport aux animaux WT, et ce même chez les animaux présymptomatiques (**figure 3**). Cependant, les souris présymptomatiques ne présentent pas d'activation microgliale importante. Ce phénomène semble survenir plus tard dans le développement de l'EAE spontanée, puisqu'on constate une augmentation marquée de l'expression de F4/80 par les cellules microgliales dans les phases aiguë et chronique de la maladie (**figure 3**). C'est également lors de ces phases que survient l'apparition de lymphocytes T auxiliaires (CD4+) à proximité des vaisseaux sanguins (**figure 4**).

On constate également la présence d'une grande quantité de cellules à proximité des vaisseaux chez les souris en phase chronique. Ces infiltrats sont entre autres constitués de macrophages et de lymphocytes T CD4+ (**figures 3 et 4**). La présence de cette grande quantité de cellules semble également avoir un impact sur l'intégrité de la membrane basale, telle qu'illustrée par la fragmentation de l'expression de la laminine, une protéine importante de la lame basale périvasculaire (**figure 3**). On remarque aussi la diminution de l'expression de la protéine des JS ZO-1 à proximité des lymphocytes T (**figure 4**). L'intensité de base (en absence d'infiltration leucocytaire) du marquage pour ces molécules ne semble néanmoins pas être modulée dans les différents stades de la maladie par rapport aux souris WT. La présence de lymphocytes T CD4+ en périphérie des vaisseaux chez les animaux en phase aiguë d'EAE spontanée ne semble pas non plus avoir d'effet sur l'expression de ZO-1 (**figure 4**).



**Figure 3. Activation microgliale et infiltration périvasculaire de macrophages lors de l'EAE spontanée.** Les macrophages (F4/80, en vert) se retrouvent à proximité de vaisseaux sanguins (identifiés par la protéine de la membrane basale laminine, en rouge), tandis que les microglies, également identifiées par le marquage du F4/80, sont répandues dans le parenchyme cérébral. L'infiltration de cellules immunitaires dans la phase chronique de l'EAE spontanée cause une déstructuration de l'expression de la laminine (flèches). Les noyaux sont marqués en bleu. n = 3 animaux par groupe; échelle = 20  $\mu$ m.



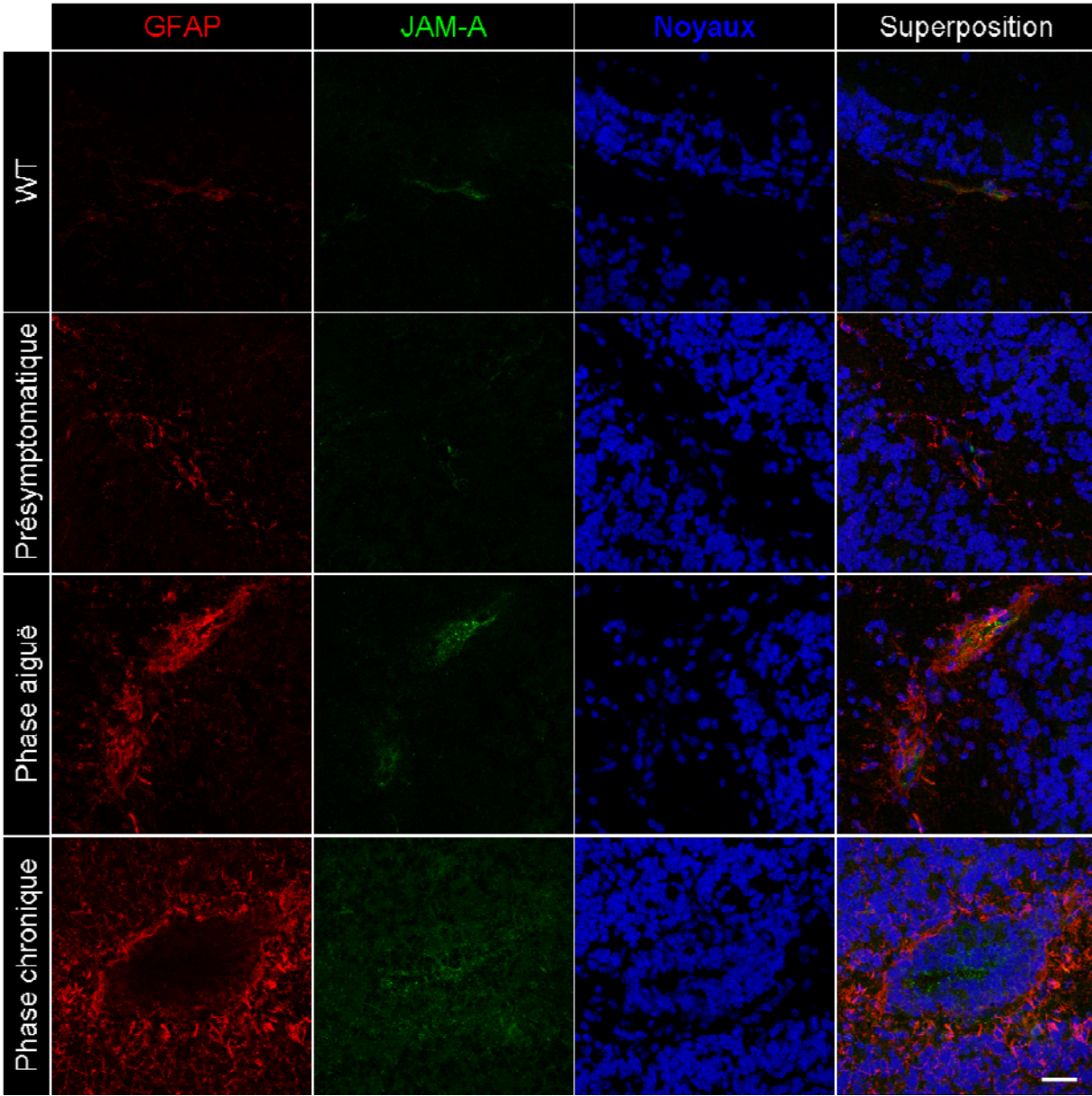
**Figure 4. Infiltration lymphocytaire et altération de l'expression de ZO-1 lors des phases aiguë et chronique de l'EAE spontanée.** La présence de lymphocytes T CD4+ (en vert) à proximité des vaisseaux sanguins et dans le parenchyme cérébral (flèches) dans les animaux TCR1640 malades est associée à la diminution de l'expression (flèches) de la protéine intracytoplasmique des JS ZO-1 (en rouge) lors de la phase chronique de l'EAE spontanée. Les noyaux sont marqués en bleu. n = 3 animaux par groupe; échelle = 20  $\mu$ m.

Outre les variations modérées dans l'expression et la localisation de la laminine et de ZO-1, il survient, lors de l'infiltration, une déstructuration massive des protéines transmembranaires des JS, tel qu'illustré par l'immunomarquage pour la protéine JAM-A chez les souris en phase aiguë ou chronique (**figure 5**). Il est important de noter que JAM-A est également exprimée par les cellules immunitaires infiltrantes, ce qui explique le marquage étendu pour JAM-A dans tout l'infiltrat périvasculaire. Dans les phases actives de la maladie, le parenchyme cérébral subit une activation inflammatoire importante. Notons l'augmentation de l'astrogliose, qui se traduit ici par l'augmentation de l'expression de la protéine GFAP. Cette protéine est associée au cytosquelette d'actine des astrocytes<sup>168</sup>. Chez les souris WT, elle est exprimée par les pieds astrocytaires qui recouvrent les CE-BHE, et plus faiblement dans le parenchyme cérébral. L'expression de GFAP augmente légèrement dans les animaux présymptomatiques, et de façon beaucoup plus marquée lors de l'apparition des symptômes cliniques. Elle atteint son paroxysme chez les animaux chroniques (**figure 5**).

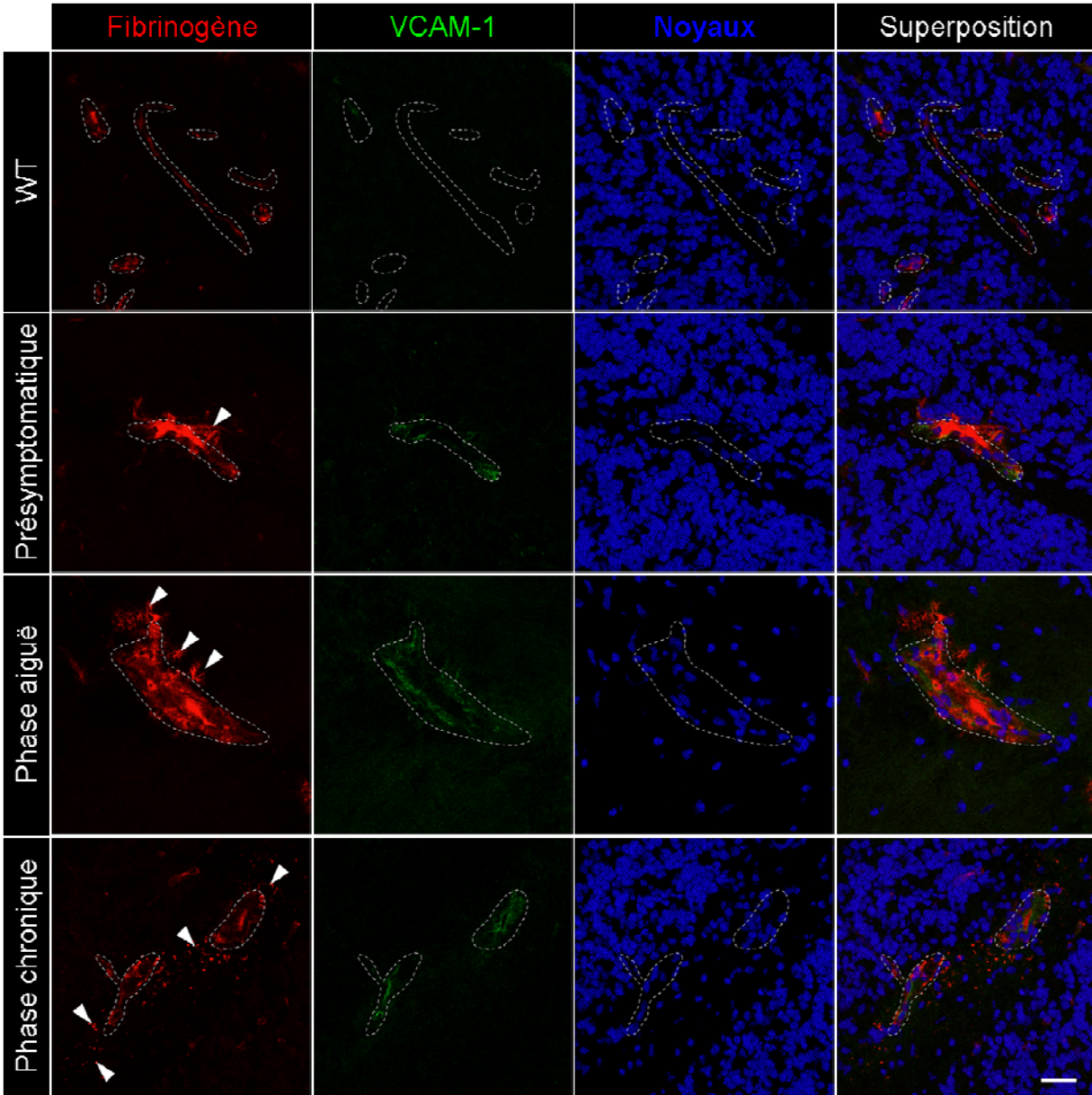
L'impact des modulations rapportées ci-haut sur l'intégrité de la BHE a été évalué par l'immunomarquage du fibrinogène (**figure 6**), un composé du sang impliqué dans la coagulation, et qui ne se retrouve normalement pas dans le parenchyme cérébral. Dans les animaux WT, le fibrinogène est détecté à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Dans les animaux présymptomatiques, on peut constater l'apparition de petits dépôts de fibrinogène à l'extérieur des vaisseaux. Ce phénomène s'accroît lors de la phase aiguë, pour atteindre son maximum en phase chronique (**figure 6**). Il est également intéressant de constater que la présence (physiologique) de fibrinogène à l'intérieur des vaisseaux sanguins est grandement diminuée chez les animaux chroniques.

Enfin, l'expression de la molécule VCAM-1, impliquée dans l'extravasation des leucocytes, a également été évaluée (**figure 6**). L'expression de VCAM-1 est modérée chez les animaux présymptomatiques, bien que déjà plus élevée que chez les animaux WT. L'expression de cette molécule s'accroît lors des phases actives de la maladie.





**Figure 5. Déstructuration de l'expression de la molécule JAM-A, associée au phénomène inflammatoire d'astroglie, lors de l'EAE spontanée.** L'expression de la molécule JAM-A (en vert) devient diffuse lors des phases actives de la maladie chez les souris atteintes d'EAE spontanée. Ce phénomène est associé à une augmentation de l'astroglie, illustrée par l'augmentation de l'expression de la protéine GFAP (en rouge). Les noyaux sont marqués en bleu. n = 3 animaux par groupe; échelle = 20  $\mu$ m.



**Figure 6. Perte de l'étanchéité de la BHE associée à l'augmentation de la molécule VCAM-1 lors de l'EAE spontanée.** La présence de dépôts (flèches) de fibrinogène (en rouge) dans le parenchyme cérébral, est associée à une augmentation de l'expression de VCAM-1 (en vert). Le contour des vaisseaux est délimité par une ligne pointillée. Les noyaux sont marqués en bleu. n = 3 animaux par groupe; échelle = 20  $\mu$ m.

### 3. Profil immunitaire des souris TCR1640

L'observation sommaire des populations leucocytaires (macrophages et lymphocytes T) entamée par IHF a été complétée par cytométrie de flux, afin de pouvoir comparer le profil immunitaire du SNC à celui des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques inguinaux) à différents stades de la maladie (voir **figure S2** en annexe pour la stratégie d'isolation des populations leucocytaires et **figure S3** pour les quadrants identifiant l'expression des différentes molécules étudiés). Un groupe contrôle (sœurs WT des animaux malades, ayant donc le même âge) a été utilisé pour chaque stade de la maladie. Les lymphocytes B ayant été étudiés en détail par le groupe du Dr Wekerle, nous avons omis cette population de notre analyse<sup>165</sup>.

Tout d'abord, le pourcentage de leucocytes périphériques a été évalué par marquage pour CD45. Les cellules exprimant fortement CD45 (CD45hi) représentent les leucocytes différenciés de la lignée hématopoïétique (**figure 7A**). On remarque un pourcentage beaucoup plus élevé de leucocytes dans le SNC des animaux en phase aiguë ou chronique d'EAE spontanée. Ces cellules correspondent vraisemblablement aux infiltrats identifiés par microscopie confocale (**figures 3 à 6**). Il semble également y avoir une grande variabilité dans le pourcentage de cellules CD45hi peuplant la rate entre les différents groupes expérimentaux. Ce résultat peut être influencé par la présence de beaucoup de débris dans les échantillons de splénocytes. En effet, le tissu conjonctif présent dans la rate est difficile à éliminer lors de l'isolation des leucocytes.

Dans les organes lymphoïdes secondaires des animaux TCR1640, on constate de plus faibles pourcentages de lymphocytes T (CD3+) à tous les stades de la maladie par rapport aux souris WT (**figure 7C**). En moyenne, on retrouve entre 85 et 92 % de cellules CD3+ dans les ganglions lymphatiques inguinaux des souris WT. Cette population semble particulièrement élevée chez les jeunes souris SJL (moyenne de 92,4% de cellules CD3+ dans le groupe contrôle du stade présymptomatique). Cependant, les souris SJL semblent avoir de plus faibles populations de cellules B par rapport à d'autres souches de souris commerciales, ce qui peut expliquer cet enrichissement apparent en lymphocytes T<sup>169</sup>. Les souris TCR1640, quant à elles, ont en moyenne 69 à 73 % de cellules exprimant CD3+ dans leurs ganglions

lymphatiques. Dans la rate, la diminution du pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup> est particulièrement frappante chez les animaux présymptomatiques. Une reconstitution partielle de cette population semble néanmoins survenir dans les stades actifs de la maladie. Cette différence est en fait causée par la diminution hautement significative dans le pourcentage de lymphocytes T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) dans tous les organes étudiés et à tous les stades de la maladie (**figure 7E**). Dans le SNC, le pourcentage de lymphocytes T est beaucoup plus élevé au stade chronique par rapport aux autres stades de la maladie (**figure 7C**). Le pourcentage de lymphocytes T auxiliaires (CD4<sup>+</sup>) est quant à lui plus élevé chez les animaux en phase aiguë ou chronique par rapport aux animaux présymptomatiques, dans le SNC comme en périphérie (**figure 7D**).

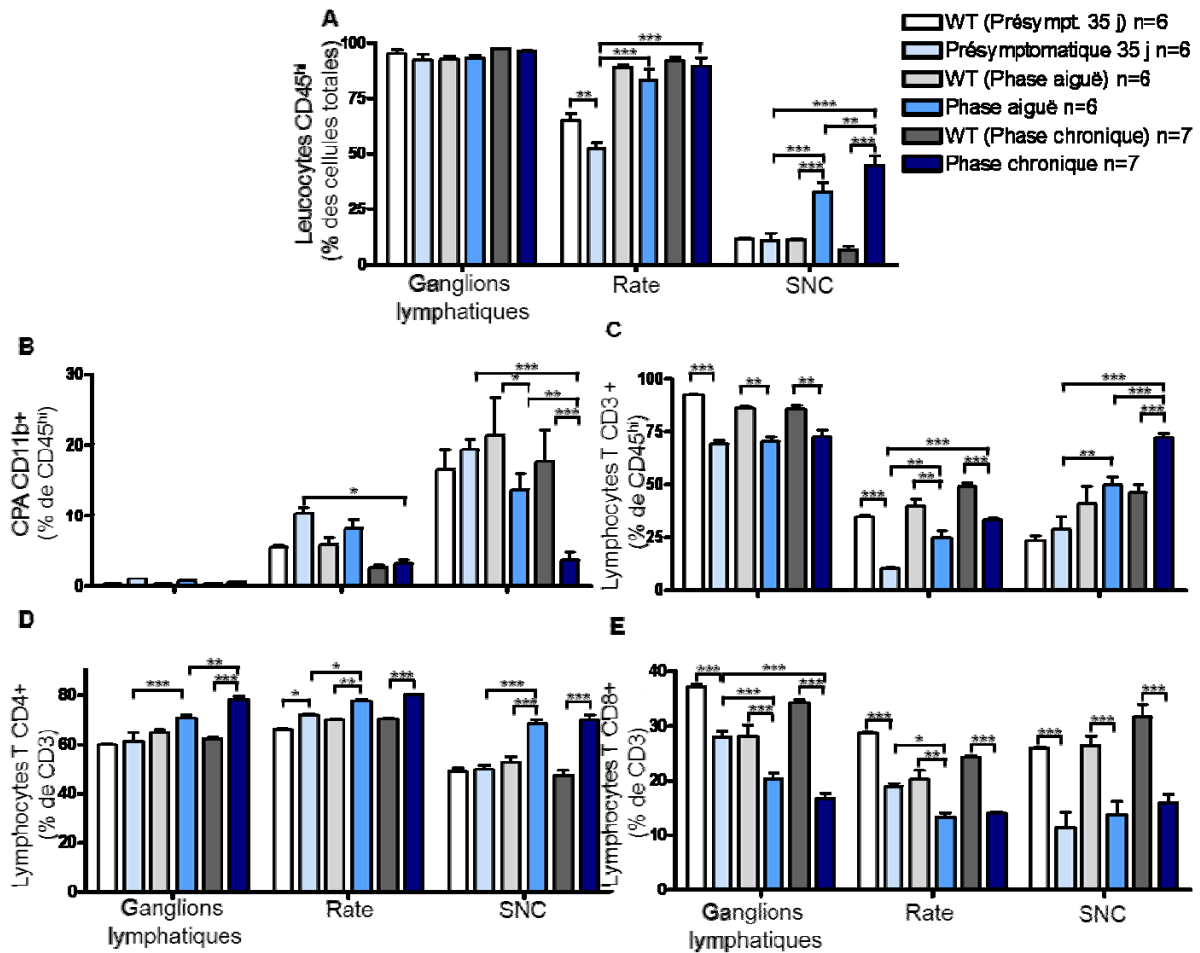
Les populations de CPA d'origine myéloïde (cellules CD11b<sup>+</sup>) ont également été observées (**figure 7B**). Lors des phases actives de l'EAE spontanée, on remarque une diminution du pourcentage de cellules CD11b<sup>+</sup> présentes dans le SNC par rapport aux populations retrouvées chez les animaux WT. De plus, les animaux présymptomatiques ont un pourcentage plus élevé de CPA CD11b<sup>+</sup> dans la rate et le SNC par rapport aux animaux en phase chronique (**figure 7B**). Il est important de noter que la microglie du SNC exprime elle aussi CD11b. C'est l'expression diminuée de CD45 par la microglie (CD45<sup>med</sup>CD11b<sup>+</sup>) qui permet de différencier ces cellules de la population de cellules CD11b<sup>+</sup> qui provient de la périphérie et qui exprime fortement CD45 (monocytes, macrophages, granulocytes, cellules NK et cellules dendritiques, CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>).

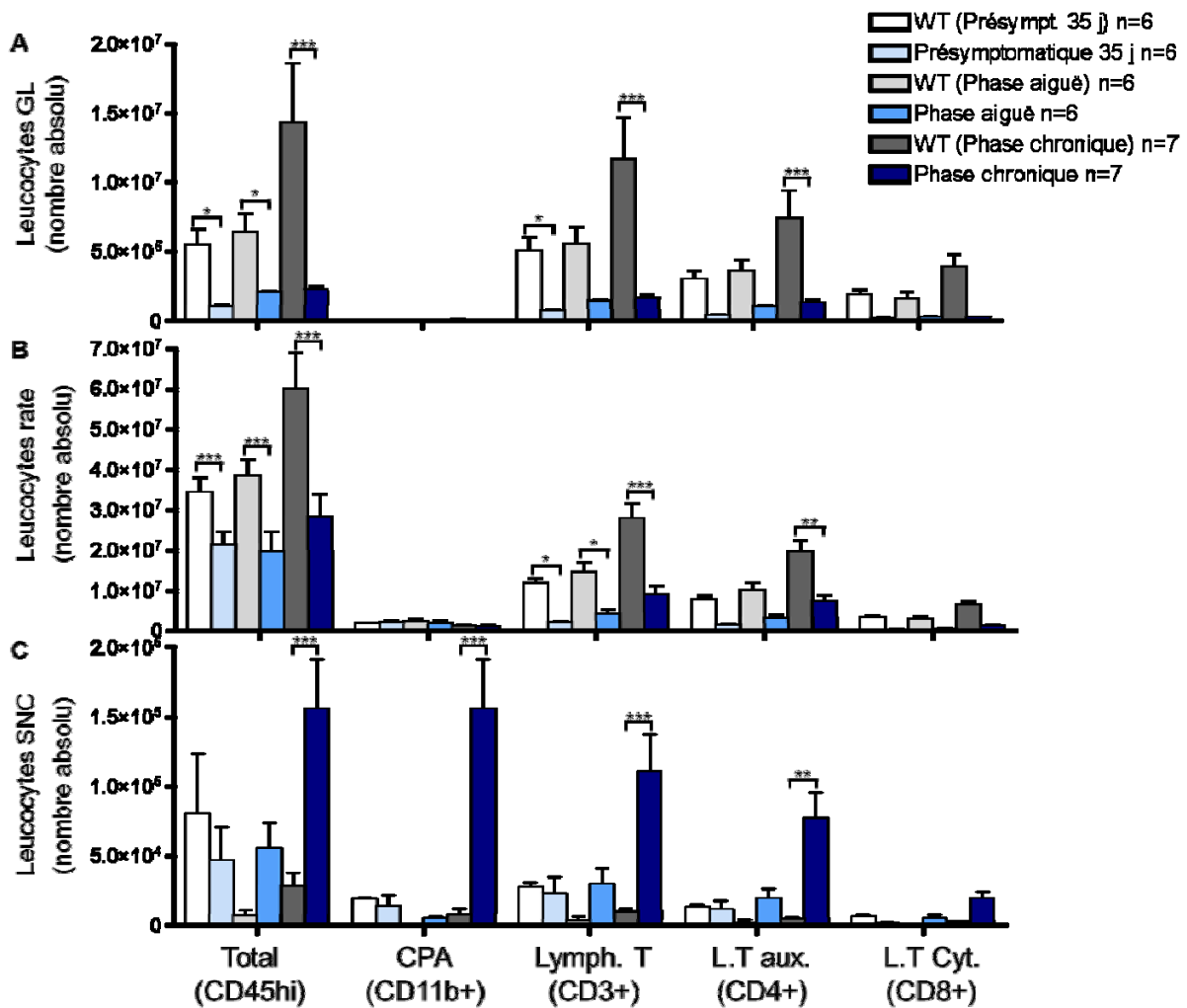
La différence la plus marquante entre les souris TCR1640 et les animaux WT réside dans le nombre total de cellules qui peuplent les organes lymphoïdes secondaires (**figure 8A et B**). En effet, le nombre total de leucocytes dans les ganglions lymphatiques inguinaux (**figure 8A**) et dans la rate (**figure 8B**) est nettement inférieur chez les animaux TCR1640 par rapport à leurs consœurs WT. Ceci semble causé par une diminution marquée du nombre de leucocytes, tandis que les populations de cellules CD11b<sup>+</sup> ne présentent pas de différence significative.

Il est également intéressant de constater que les animaux en phase aiguë de la maladie n'ont pas un nombre total de cellules immunitaires significativement plus élevé dans le SNC par rapport aux animaux WT. Les différences importantes (bien que non significatives) entre

les populations de leucocytes obtenues dans le SNC pour différents groupes d'animaux WT s'expliquent par le nombre de cellules hautement variable recueilli lors de l'extraction des leucocytes du tissu cérébral. Les seuls animaux qui présentent une infiltration leucocytaire massive et significative sont les souris en phase chronique (**figure 8C**). Ceci reflète les observations faites par microscopie confocale.

Étant donné les grandes différences en nombre absolu de leucocytes entre les souris WT et les souris TCR1640, toute la caractérisation subséquente du profil immunitaire en périphérie a été réalisée uniquement en pourcentages. Ceci permet de témoigner de façon précise de l'enrichissement dans l'expression de différentes molécules dans différentes populations leucocytaires de souris TCR1640, même si le nombre absolu de cellules reste inférieur à celui retrouvé chez les souris WT.





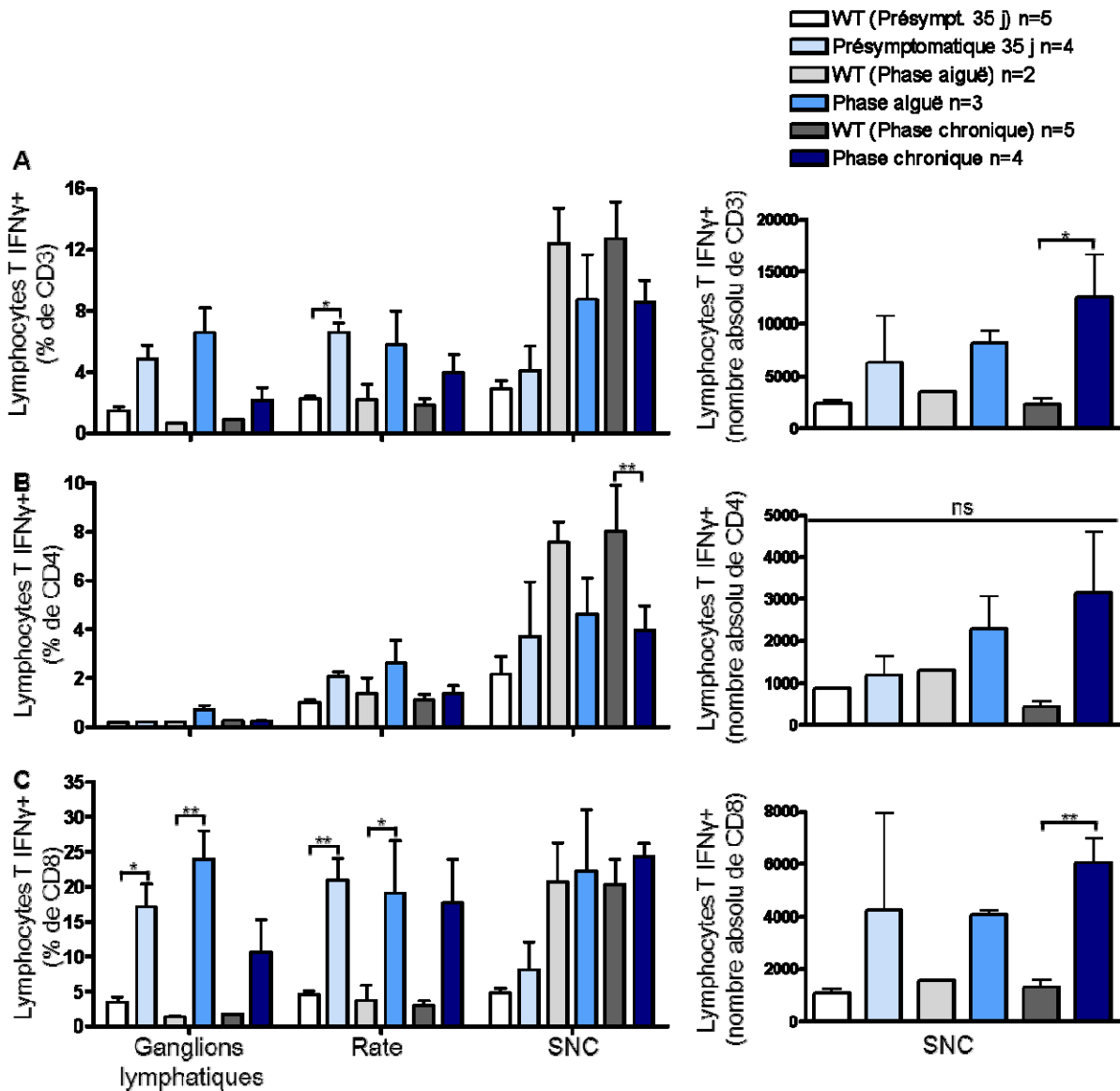
L'activation leucocytaire a été évaluée par l'étude de la production de deux cytokines proinflammatoires associées aux phénomènes pathologiques de la SEP et de l'EAE, l'IFN $\gamma$  et l'IL-17. Ces cytokines n'étant pas exprimées par les CPA, nous avons restreint notre analyse aux lymphocytes.

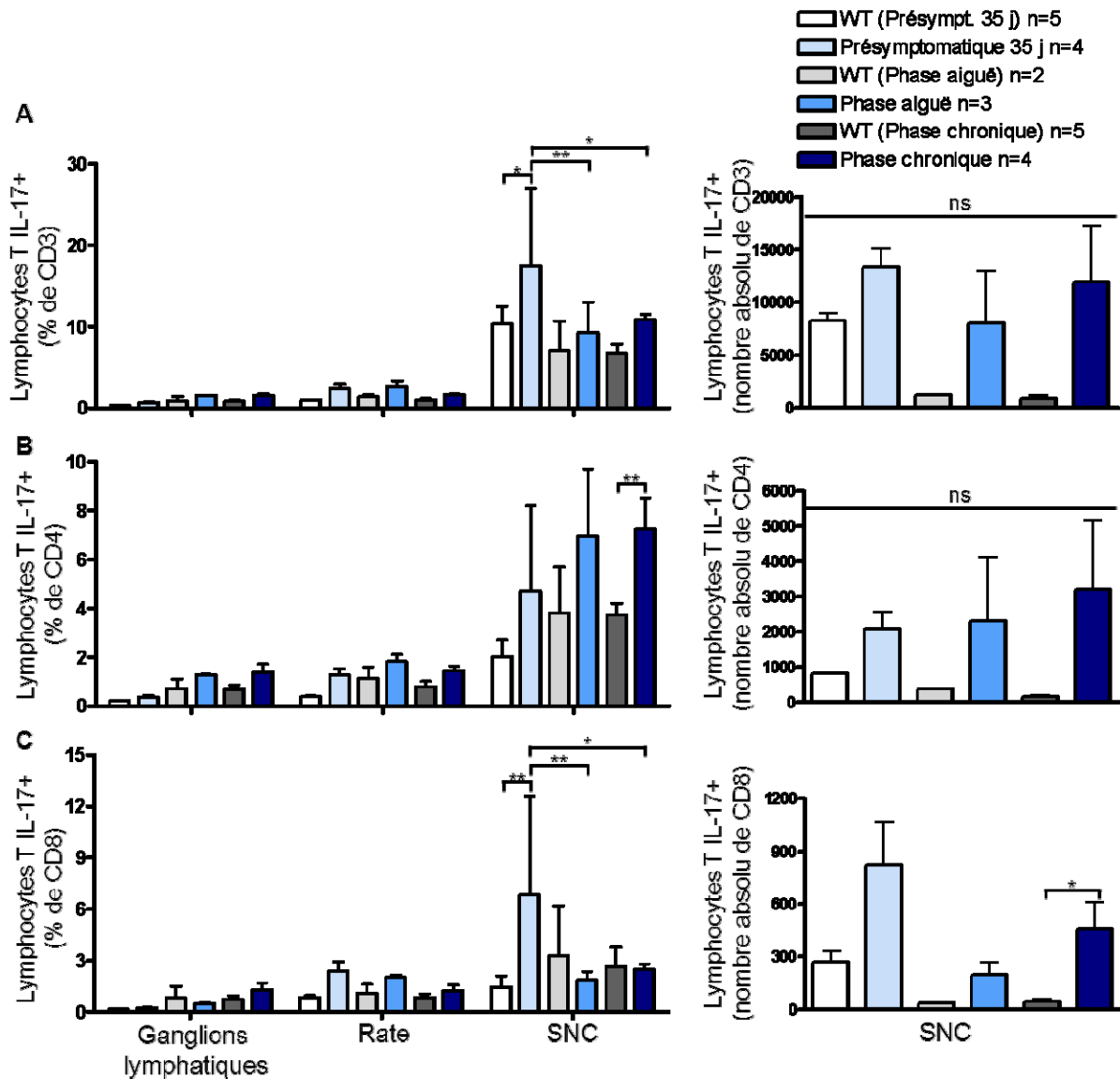
De façon générale, l'ensemble des lymphocytes T (cellules CD3+) semble produire plus d'IFN $\gamma$  en périphérie chez les animaux TCR1640 par rapport aux souris WT (**figure 9A**). Dans le SNC, l'expression relative de l'IFN $\gamma$  dans les lymphocytes T n'est pas plus élevée par rapport aux animaux contrôle. En nombre absolu, on voit néanmoins que plus de lymphocytes T semblent produire de l'IFN $\gamma$  dans les stades actifs de l'EAE spontanée, bien que la différence ne soit significative qu'au stade chronique de la maladie (**figure 9A**). Il semble y avoir un pourcentage élevé de cellules produisant de l'IFN $\gamma$  chez les animaux WT. Par exemple, environ 20 % de la population de lymphocytes T CD8+ dans le SNC des souris WT (groupes contrôles pour les stades aigu et chronique de la maladie) produit de l'IFN $\gamma$  (**figure 9C**, panneau de gauche). Ce phénomène s'explique par le très faible nombre de cellules immunitaires qu'on retrouve au sein du SNC; les cellules immunitaires présentes dans le cerveau d'un animal sain exercent peut-être de la surveillance immunitaire, ou ont été recrutées au SNC à la suite d'un événement inflammatoire local. Il est donc attendu que ces cellules soient activées, et qu'elles puissent sécréter des cytokines proinflammatoires telles que l'IFN $\gamma$  afin de promouvoir localement la réponse immunitaire. En nombre absolu (**figure 9C**, panneau de droite), cet enrichissement dans la proportion de leucocytes produisant de l'IFN $\gamma$  chez les souris WT disparaît. La tendance observée pour les lymphocytes T totaux se maintient dans la sous-population de lymphocytes T CD4+, bien que les résultats ne soient pas significatifs (**figure 9B**). Dans la sous-population de lymphocytes T CD8+, on remarque une augmentation massive de l'expression de l'IFN $\gamma$  en périphérie chez tous les animaux TCR1640. Les différences ne sont encore une fois pas significatives dans le SNC, sauf en nombre absolu chez les souris en phase chronique (**figure 9C**). Le fait que ce résultat soit significatif pour les souris en phase chronique d'EAE spontanée peut sembler surprenant, étant donné l'absence de différences significatives en phase chronique (par rapport aux souris WT) en ce qui concerne le nombre absolu de cellules T CD8+ (**figure 8C**) ainsi que le pourcentage de cellules T CD8+ produisant l'IFN $\gamma$  (**figure 9C**, panneau de gauche). Cependant, il est facile de constater qu'il semble y avoir une plus grande population de cellules T CD8+ chez les



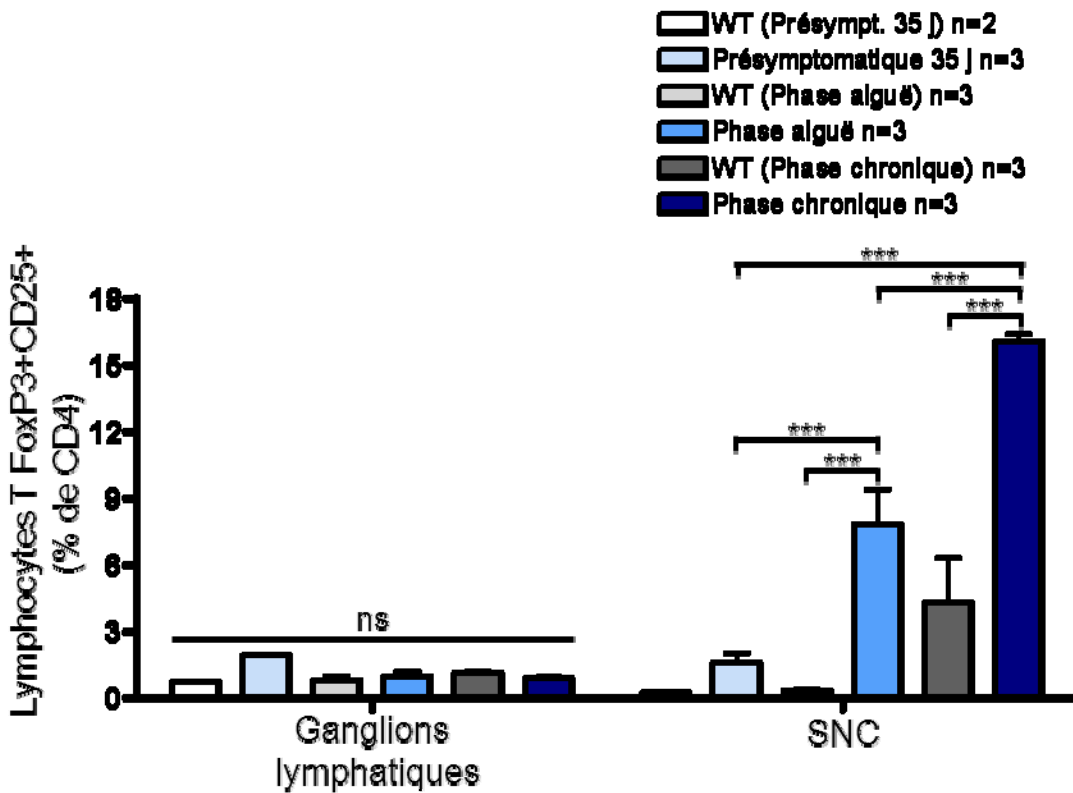
animaux TCR1640 en phase chronique dans ces deux cas, bien que les différences ne soient pas significatives. Comme le nombre absolu de cellules T CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN $\gamma$  est calculé en multipliant les valeurs obtenues pour chaque souris (nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> multiplié par le pourcentage de CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN $\gamma$ ), il est possible que le résultat calculé pour la population finale soit significatif, bien que les deux autres populations ne soient pas significativement différentes. Cependant, augmenter le nombre d'animaux par groupe permettrait peut-être de mettre à jour des différences statistiques significatives.

On ne constate pas non plus de différences significatives dans l'expression de l'IL-17 en périphérie entre les animaux WT et les souris TCR1640, peu importe le stade de la maladie. Cependant, il semblerait y avoir une tendance à ce que les souris TCR aient un pourcentage d'expression de l'IL-17 légèrement plus élevé que leurs consœurs WT, autant en périphérie que dans le SNC (figure 10A à C). Les seules différences significatives observées sont une augmentation en pourcentage de la proportion de lymphocytes T auxiliaires exprimant l'IL-17 en phase chronique (**figure 10B**), une augmentation du pourcentage de lymphocytes T cytotoxiques exprimant l'IL-17 dans les animaux présymptomatiques, et une augmentation du nombre absolu de lymphocytes T cytotoxiques produisant l'IL-17, toutes trois dans le SNC (**figure 10C**).





Enfin, nous avons évalué la présence de lymphocytes T régulateurs (Treg), une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> caractérisée par la coexpression de CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de la cytokine IL-2, associée au contrôle de la réponse immunitaire pro-inflammatoire) et du facteur de transcription FoxP3 (*forkhead box P3*), qui se lie à la zone promotrice de plusieurs gènes associés à l'activité des lymphocytes T<sup>170</sup>. Le pourcentage de Treg présents dans la rate étant très faible, cet organe a été omis pour l'analyse. Bien qu'il n'y ait pas de différence dans les proportions de Treg dans les ganglions lymphatiques inguinaux, la population de ce sous-type augmente de façon marquée dans le SNC lors des phases actives de la maladie (particulièrement chez les souris en phase chronique). Les souris en phase présymptomatique ne présentent pas d'augmentation significative de cette population par rapport aux animaux WT (**figure 11**).



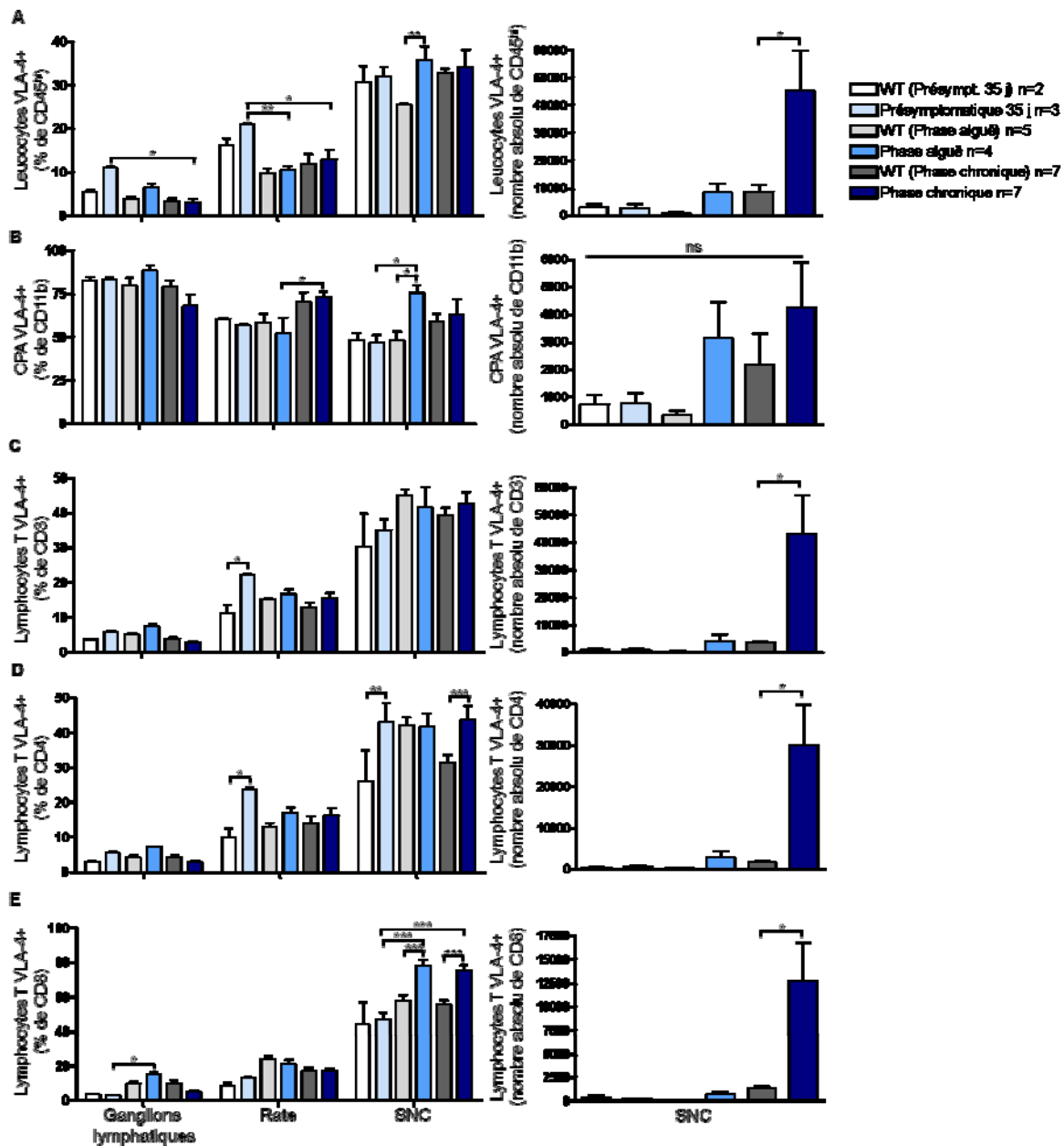
**Figure 11. Augmentation du pourcentage de cellules T régulatrices au sein du SNC dans les phases actives de l'EAE spontanée.** Augmentation du pourcentage de cellules T régulatrices CD3+CD4+CD25+FoxP3+ par rapport à la population globale de lymphocytes T (CD3+) dans le SNC d'animaux TCR1640 en phases aiguë et chronique d'EAE spontanée par rapport au stade présymptomatique et aux groupes WT. Moyenne  $\pm$  écart-type. *Légende* : WT (présymptomatique 35 j) n = 2, représentatif de 5 souris; Présymptomatique 35 j n = 3, représentatif de 6 souris; WT (Phase aiguë) n = 3, représentatif de 5 souris; Phase aiguë n = 3, représentatif de 6 souris; WT (Phase chronique) n = 3, représentatif de 5 souris; Phase chronique n = 3, représentatif de 5 souris; ns = non significatif; \*\*\* = p < 0.001.

Pour compléter cette caractérisation immunitaire, l'expression de différentes molécules impliquées dans la transmigration des leucocytes a été évaluée.

En premier lieu, l'expression de l'intégrine VLA-4, impliquée dans la migration transendothéliale de la majorité des cellules immunitaires, a été étudiée. Il est intéressant de noter que l'expression globale de VLA-4 est plus élevée en périphérie chez les animaux présymptomatiques (rate et ganglions lymphatiques inguinaux), par rapport aux souris en stade actif de la maladie (**figure 12A**). Dans le SNC, il y a une augmentation relative du niveau d'expression global de VLA-4 en phase aiguë. Ce résultat n'est pas significatif en nombre absolu, tandis qu'on voit une population significativement plus importante de leucocytes exprimant VLA-4 dans le CNS en phase chronique.

Chez les CPA CD11b+, on constate une augmentation significative du pourcentage de cellules qui expriment VLA-4 dans le SNC lors de la phase aiguë. Cette différence n'est cependant pas significative en nombre absolu (**figure 12B**). Pour ce qui est des lymphocytes T (CD3+), on note une augmentation relative de l'expression de VLA-4 dans la rate chez les souris présymptomatiques (**figure 12C**). En nombre absolu, il y a un enrichissement notoire de la population de lymphocytes T CD3+ exprimant VLA-4.

Chez les souris présymptomatiques, les lymphocytes T CD4+ montrent une augmentation significative de l'expression relative de VLA-4 en périphérie (dans la rate) et dans le SNC (**figure 12D**). Il y a également une augmentation de l'expression de VLA-4 dans le SNC en phase chronique, autant en pourcentage qu'en nombre absolu. Enfin, on constate un enrichissement significatif en VLA-4 dans les populations de lymphocytes T CD8+ présentes dans le SNC lors des phases actives de l'EAE spontanée (phases aiguë et chronique) (**figure 12E**).

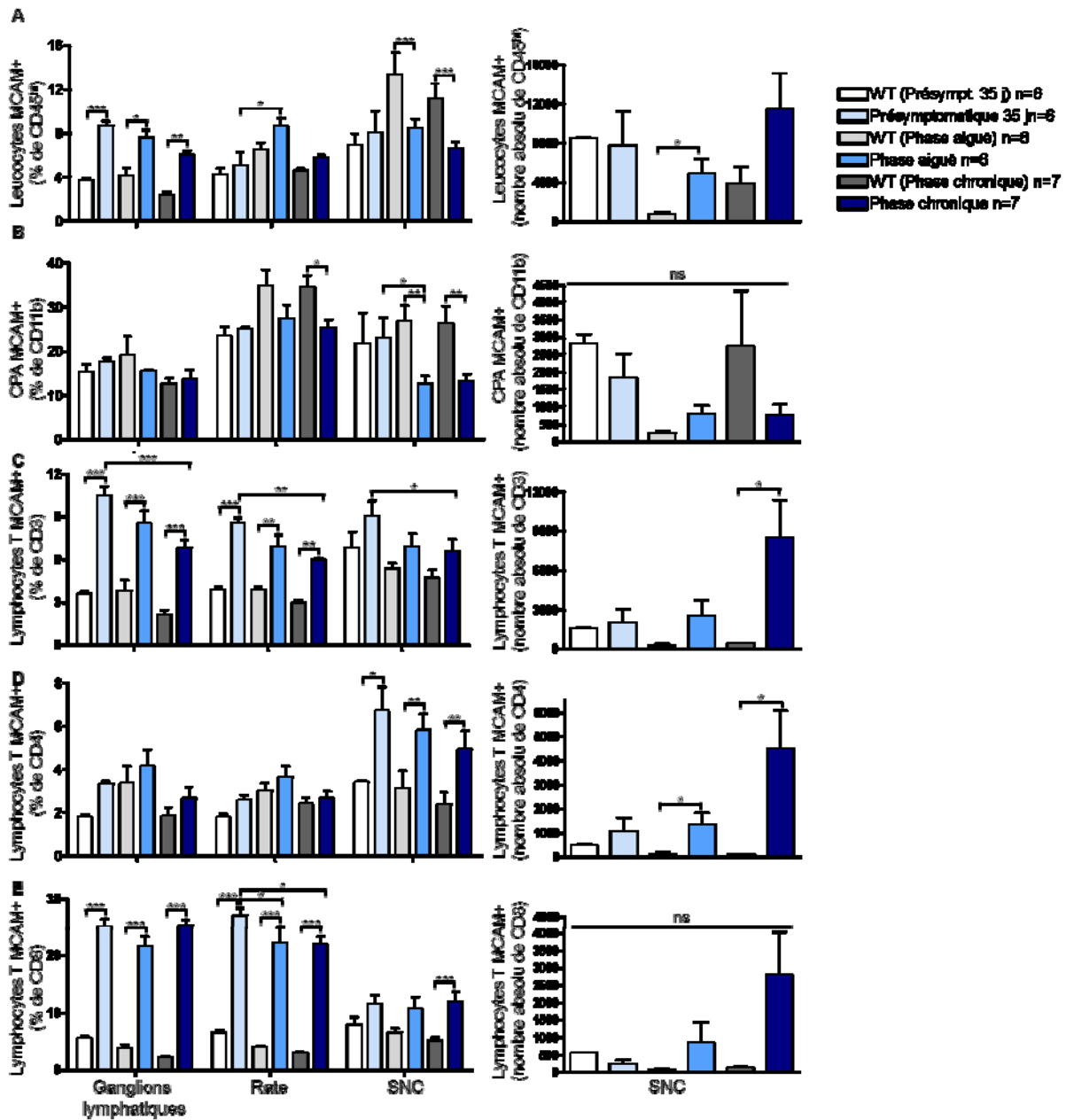


Les différences dans l'enrichissement en VLA-4 chez les lymphocytes T et les CPA CD11b<sup>+</sup> ne sont pas particulièrement frappantes dans le modèle TCR1640. Nous avons également étudié l'expression de deux autres CAM qui ont un rôle dans la migration de leucocytes proinflammatoires impliqués dans la physiopathologie de la SEP et de l'EAE, MCAM et ALCAM (**figures 13 et 14**).

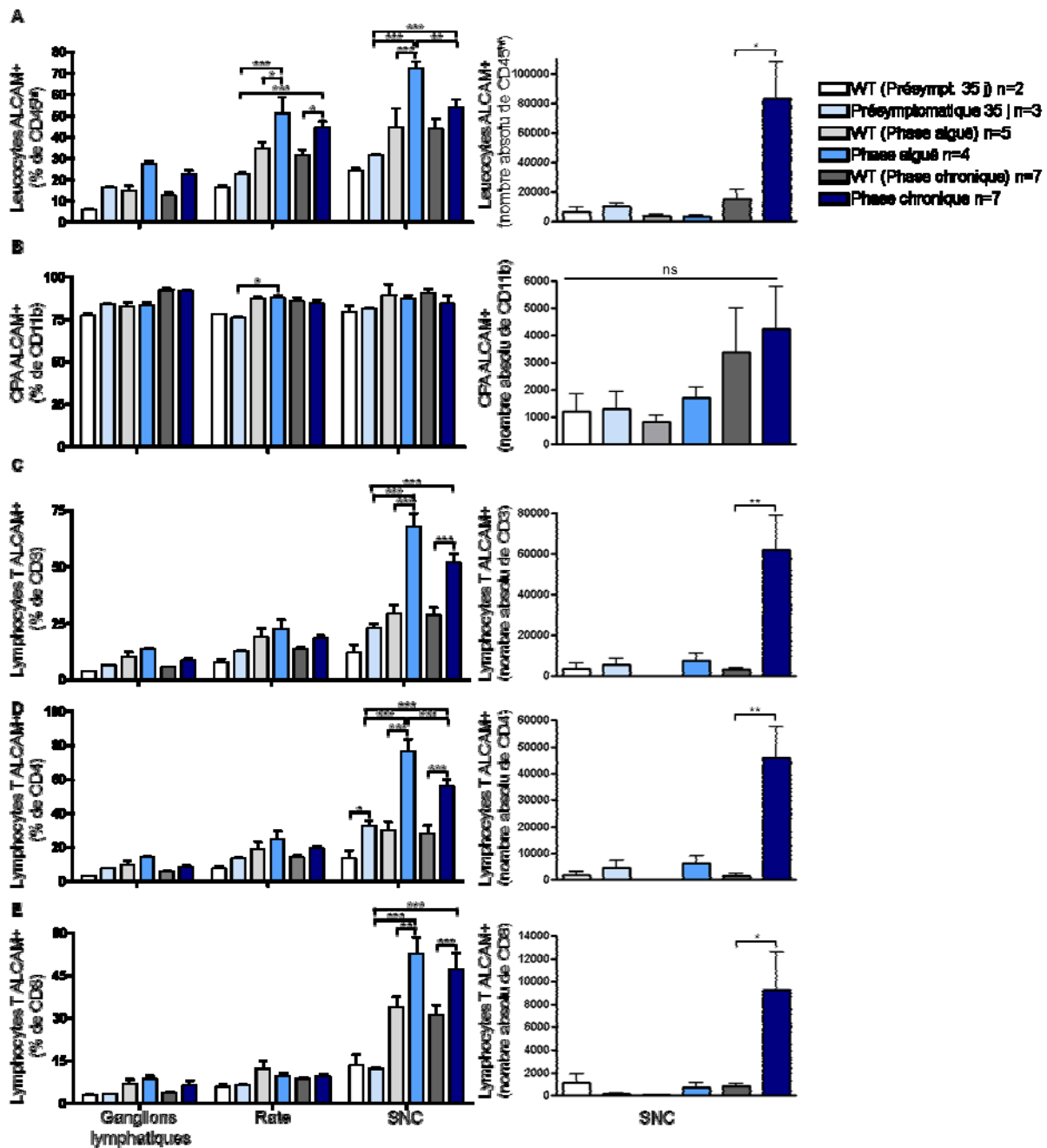
De façon générale, MCAM est plus fortement exprimée par les leucocytes périphériques (dans les ganglions lymphatiques inguinaux) chez les souris TCR1640 par rapport à leurs sœurs WT (**figure 13A**). Dans le SNC, MCAM est par contre plus faiblement exprimée chez les souris TCR1640 (**figure 13A**). Ceci s'explique cependant par le très faible taux d'expression de MCAM sur les CPA CD11b<sup>+</sup> des souris TCR1640 (**figure 13B**). Dans la population globale de lymphocytes T, MCAM est beaucoup plus fortement exprimée chez les souris TCR1640, dans tous les organes et à tous les stades de la maladie (**figure 13C**). En séparant les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques, on remarque une augmentation hautement significative de l'expression de MCAM dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui peuplent le SNC (**figure 13D**), et dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en périphérie (**figure 13E**). Cette expression est maintenue dans tous les stades de la maladie.

En ce qui concerne l'expression d'ALCAM, on constate globalement une plus grande présence de cette molécule dans les phases actives de l'EAE spontanée (significative dans la rate et le SNC) (**figure 14A**). Il n'y a pas de différence notable dans l'expression d'ALCAM chez les CPA CD11b<sup>+</sup> (**figure 14B**). Cependant, les lymphocytes T expriment fortement ALCAM dans le SNC lors des phases actives de la maladie par rapport aux animaux présymptomatiques (**figure 14C**). On constate ce changement autant dans les populations de lymphocytes T auxiliaires (**figure 14D**) que cytotoxiques (**figure 14E**), bien que l'augmentation soit plus marquée chez ces premiers.





**Figure 13. Augmentation de l'expression de MCAM dans le modèle TCR1640.** L'expression de MCAM a été étudiée dans la population de leucocytes totaux (CD45hi) (A), dans les CPA CD11b+ (B), dans les lymphocytes T (CD3+) (C), dans les lymphocytes T auxiliaires (CD3+CD4+) (D) et dans les lymphocytes T cytotoxiques (CD3+CD8+) (E). Dans le SNC, l'expression relative de MCAM est augmentée dans les lymphocytes T CD4+ pour tous les stades d'EAE spontanée (D). En nombre absolu, cette différence reste significative en phase aiguë et chronique (D, panneau de droite). En périphérie, l'expression relative de MCAM est augmentée dans les lymphocytes T CD8+ pour tous les stades d'EAE spontanée (E). Moyenne  $\pm$  écart-type. *Légende* : WT (présymptomatique 35 j) n = 6; Présymptomatique 35 j n = 6; WT (Phase aiguë) n = 6, représentatif de 8 souris; Phase aiguë n = 6; WT (Phase chronique) n = 7, représentatif de 16 souris; Phase chronique n = 7, représentatif de 12 souris; nombre absolu = nombre absolu moyen par cerveau; ns = non significatif; \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ .



**Figure 14. Augmentation de l'expression d'ALCAM dans le modèle TCR1640.** L'expression d'ALCAM a été étudiée dans la population de leucocytes totaux (CD45hi) (A), dans les CPA CD11b+ (B), dans les lymphocytes T (CD3+) (C), dans les lymphocytes T auxiliaires (CD3+CD4+) (D) et dans les lymphocytes T cytotoxiques (CD3+CD8+) (E). Dans le SNC, l'expression relative d'ALCAM est augmentée dans tous les lymphocytes T en stade actif d'EAE spontanée (C, D, E). En nombre absolu, cette différence reste significative en phase chronique seulement (C, D, E, panneau de droite). Moyenne  $\pm$  écart-type. *Légende* : WT (présymptomatique 35 j) n = 2, représentatif de 5 souris; Présymptomatique 35 j n = 3, représentatif de 6 souris; WT (Phase aiguë) n = 5, représentatif de 6 souris; Phase aiguë n = 4; WT (Phase chronique) n = 7, représentatif de 16 souris; Phase chronique n = 7, représentatif de 12 souris; nombre absolu = nombre absolu moyen par cerveau; ns = non significatif; \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ .

## 4. Modulation de l'EAE dans le modèle TCR1640

La dernière partie de ce projet visait à évaluer notre capacité à moduler la maladie développée par les animaux TCR1640. Pour ce faire, nous avons choisi de traiter les souris avec un anticorps bloquant anti-VLA-4, analogue du Natalizumab utilisé dans le traitement de la SEP. Cette thérapie permet une diminution variable des symptômes dans l'EAE classique<sup>123, 143, 171</sup>.

L'utilisation du modèle TCR1640 pour des expériences *in vivo* pose cependant certains inconvénients. En effet, la grande variabilité dans le délai d'apparition des symptômes rend difficile la comparaison des résultats entre deux groupes expérimentaux. Plus concrètement, le traitement avec des doses bihebdomadaires d'anticorps anti-VLA-4 dans des souris TCR1640 présymptomatiques n'a pas permis d'obtenir une modulation significative de la maladie par rapport au groupe contrôle recevant du PBS (données non présentées).

Nous nous sommes donc tournés vers un modèle de transfert adoptif de cellules T CD4+, adapté aux souris TCR1640. Des splénocytes ont été isolés de souris TCR1640 présymptomatiques et réactivés *in vitro*. Les lymphocytes T CD4+ ont ensuite été isolés et injectés à des souris SJL WT. L'état d'activation des cellules a été évalué par cytométrie de flux avant stimulation *in vitro* et après purification (**figure 15**). Les lymphocytes T (CD3+) fraîchement isolés (*ex vivo*) sont constitués de 67,9 % de lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et de 21,5 % de lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). *Ex vivo*, les lymphocytes T CD4+ expriment faiblement les cytokines proinflammatoires IL-17 et IFN $\gamma$  (1,6 % et 4,6 % d'expression, respectivement) (**figure 15A**). Après re-stimulation *in vitro* et purification par sélection négative, les lymphocytes T CD4+ constituent 95,4 % de la population de lymphocytes totaux. Leur expression d'IL-17 et d'IFN $\gamma$  est également grandement augmentée (15,6 % et 14,8 %, respectivement) (**figure 15B**). On note également que 16,7 % des cellules T CD4+ purifiées expriment à la fois l'IL-17 et l'IFN $\gamma$ . Ce profil d'expression est absent des cellules *ex vivo*.

L'expression des trois CAM étudiées dans ce projet de recherche a également été comparée avant et après activation (**figure 15**). Les cellules réactivées et purifiées présentent une augmentation de 9,2 % de l'expression de VLA-4 et une augmentation de 50,1 % de

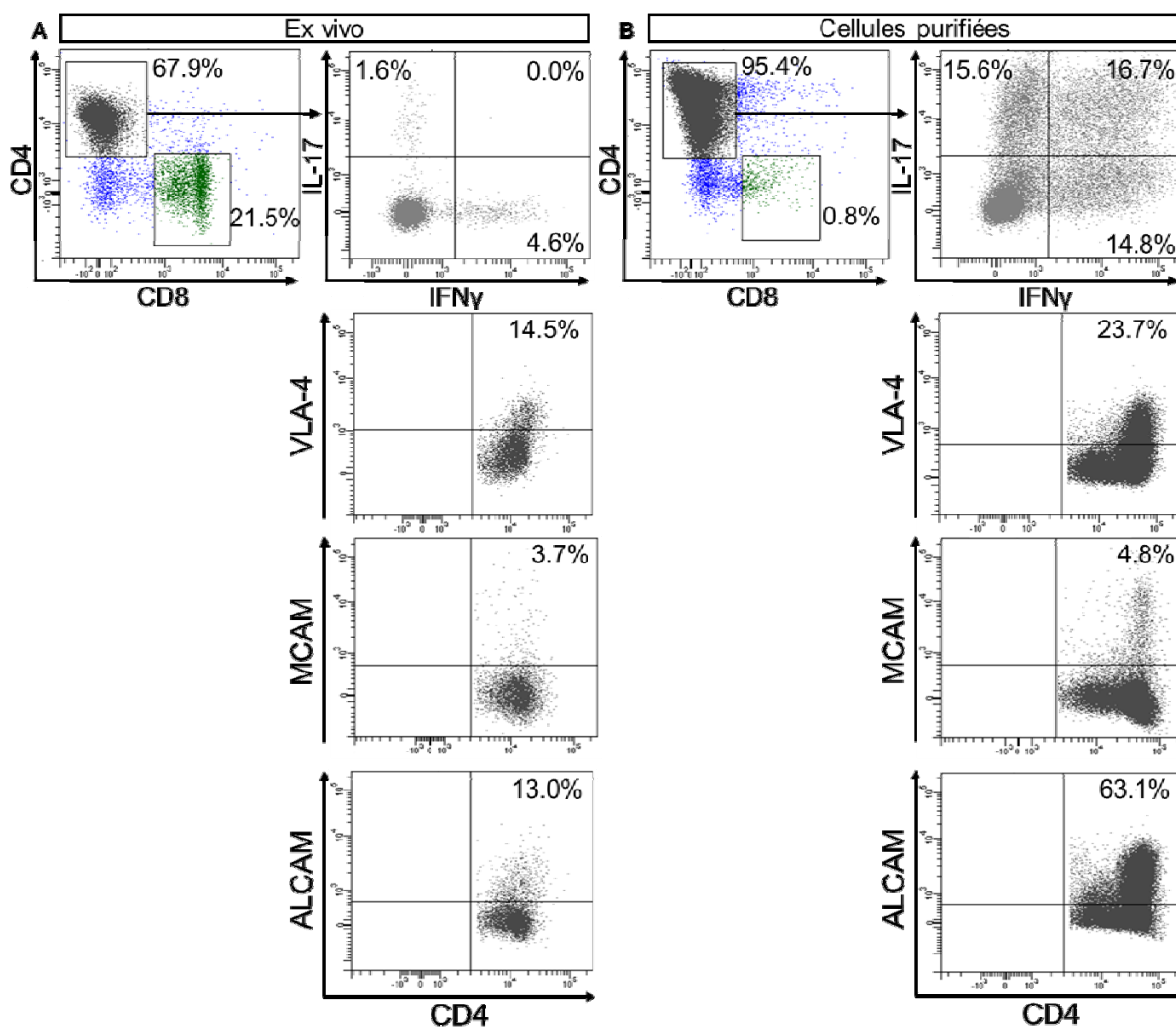
l'expression d'ALCAM. Il n'y a pas de changement notable dans l'expression de MCAM (3,7 % avant réactivation, et 4,8 % après purification) (**figure 15**).

La maladie développée par les souris WT ayant reçu les cellules T CD4+ réactivées présente deux épisodes distincts de paralysie suivis d'une phase de stabilisation des symptômes, qui rappellent la forme cyclique de l'EAE dans les souris TCR1640 (**figure 16A**). Le premier épisode, plus sévère, est accompagné d'une perte de poids importante (**figure 16B**).

Les souris WT ayant reçu des cellules T CD4+ activées ont été traitées avec l'anticorps anti-VLA-4 ou du PBS pour le groupe contrôle (**figure 17**). L'observation quotidienne des souris a permis de constater que les souris traitées avec l'anticorps anti-VLA-4 présentaient un retard dans le développement des symptômes d'EAE par rapport aux souris contrôle. Il est important de noter que cette expérience est différente de l'expérience présentée à la **figure 16** (deux groupes d'animaux différents soumis au même protocole d'immunisation), ce qui explique la variabilité dans le délai d'apparition des symptômes (pour le groupe PBS) entre ces deux courbes. L'analyse statistique permet d'obtenir des différences significatives dans la sévérité de la maladie aux jours 11 et 12 post-transfert (**figure 17A**). La moyenne pour le délai d'apparition des symptômes après transfert est également significativement plus élevée chez les souris traitées avec l'anti-VLA-4 par rapport au groupe contrôle (délai moyen de 12 jours versus 8 jours) (**figure 17B**).

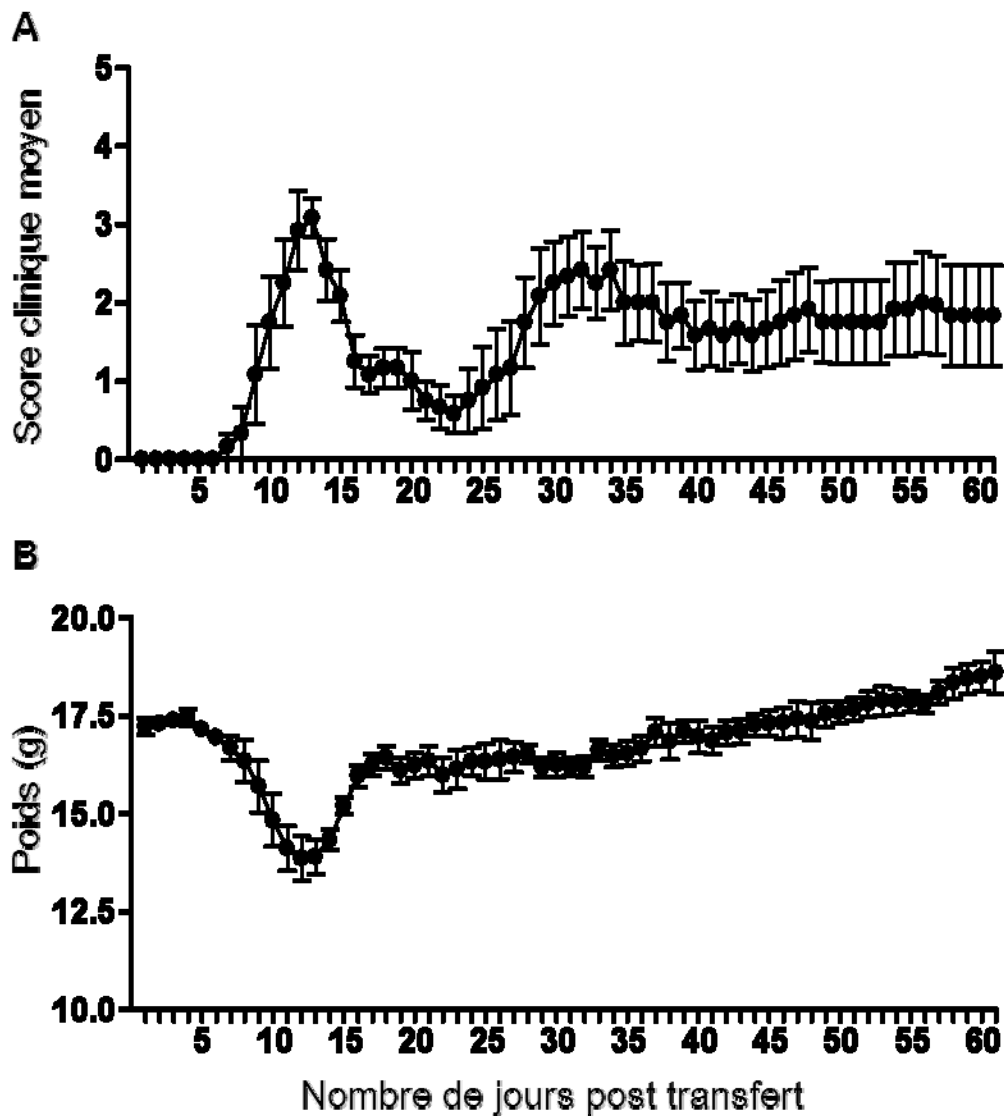
Afin de pouvoir mieux visualiser les différences éventuelles dans la gravité des épisodes d'EAE ou dans la forme de maladie entre les deux groupes expérimentaux, le délai d'apparition des symptômes a été normalisé pour chaque souris à la valeur moyenne obtenue pour son groupe expérimental (**figure 17C**). Par exemple, pour les souris du groupe PBS, le premier score clinique supérieur à zéro a été ajusté à 8 jours. Ceci permet d'homogénéiser les courbes qui décrivent le score clinique dans chacun des groupes. Les données présentées ainsi permettent de montrer que le premier épisode d'EAE est similaire en gravité et en durée entre les deux groupes. Ceci est confirmé par l'analyse des moyennes obtenues pour le score maximal dans chacun des groupes, qui ne présente pas de différence significative (**figure 17D**). La présentation normalisée permet également de mettre à jour la présence d'un

deuxième épisode d'EAE, qui est d'une sévérité moindre et qui survient dans des délais

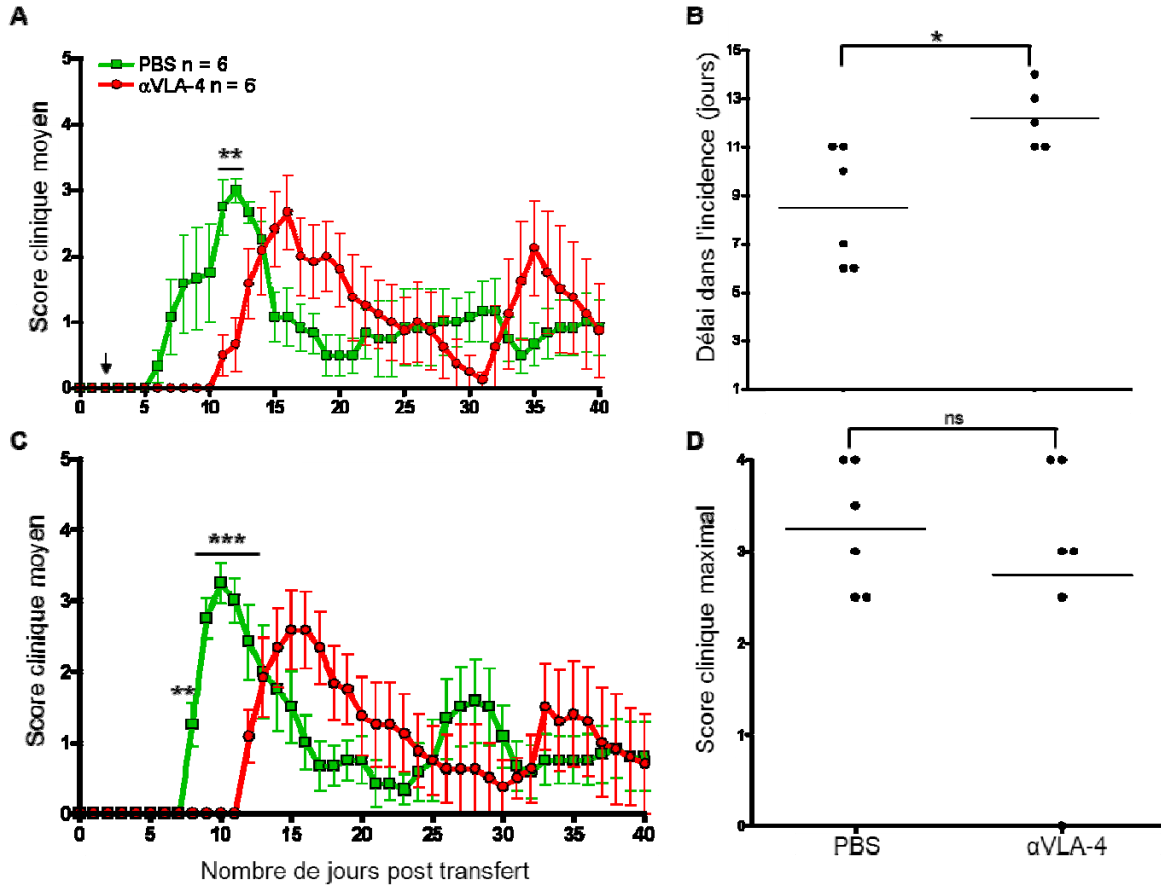


similaires dans les deux groupes expérimentaux.

**Figure 15. Profil d'activation des lymphocytes T CD4+ en vue d'un transfert adoptif de dans le modèle TCR1640.** Le profil d'activation de la population de lymphocytes T auxiliaires (CD4+) isolés à partir de splénocytes d'animaux TCR1640 présymptomatiques est comparé *ex vivo* (A) et après réactivation *in vitro* (quatre jours en présence de CPA, d'anti-CD3, d'IL-12, d'IL-23, d'IL-6 et de TGF- $\beta$ ) et purification par sélection négative pour enrichir la population de lymphocytes T CD4+ (B). *Ex vivo*, les lymphocytes T CD4+ forment 67,9 % de la population de cellules T CD3+ (A). Après purification, les lymphocytes T CD4+ composent 95,4 % de la population de cellules T CD3+ (B). Leur expression des cytokines proinflammatoires IL-17 et IFN $\gamma$ , ainsi que de VLA-4 et d'ALCAM, est nettement plus élevée que dans les cellules *ex vivo* (B). Cytométrie de flux effectuée sur les splénocytes provenant de n = 11 souris.



**Figure 16. Développement d'une forme cyclique d'EAE lors du transfert adoptif dans des animaux WT de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> réactivés en provenance de souris TCR1640.** Les souris WT reçoivent par voie intra-péritonéale 8 millions de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> réactivés en provenance de souris TCR1640. Les premiers signes d'EAE apparaissent au jour 7 post transfert, et la maladie est composée de deux épisodes distincts qui sont suivis d'une stabilisation des symptômes (A). Le premier épisode est le plus sévère, et il est accompagné d'une perte de poids importante (B). Représentatif de n = 10 animaux, moyenne de deux expériences différentes. Moyenne ± écart-type.



**Figure 17. Le traitement avec l'anticorps anti-VLA-4 retarde l'apparition de symptômes d'EAE dans le modèle de transfert adoptif chez les souris TCR1640.** La courbe de paralysie moyenne pour les groupes PBS (en vert, n = 6) et α-VLA-4 (en rouge, n = 6) permet de constater un retard dans le développement de l'EAE dans le groupe α-VLA-4 (A). Le délai d'apparition des symptômes est significativement plus élevé dans le groupe α-VLA-4 (B). La majoration de l'apparition des symptômes au délai moyen de chaque groupe ne met à jour aucune autre différence entre les deux groupes (C). Le score clinique maximal n'est pas significativement différent entre le groupe PBS et le groupe α-VLA-4 (D). La même expérience est représentée en (A) et (C). Cependant, la courbe clinique de chaque souris a été modifiée en (C), en déplaçant le premier jour de maladie pour chaque souris au jour moyen obtenu pour chaque groupe en (B) (jour 8 pour le groupe PBS; jour 12 pour le groupe α-VLA-4). Une souris du groupe α-VLA-4 a été omise pour l'analyse en (B) puisqu'elle n'a jamais développé de symptômes. Moyenne ± écart-type. *Légende* : ns = non significatif; \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0.001; la flèche en (A) représente la première injection d'α-VLA-4 ou de PBS.

## Discussion

L'étude des souris TCR1640 atteintes d'EAE spontanée réalisée ici visait à approfondir la caractérisation de ce nouveau modèle expérimental de la SEP. Bien que cette étude ne soit pas assez poussée pour nous permettre de faire directement des comparaisons entre le modèle d'EAE classique, le modèle TCR1640 et les phénomènes neuro-immunitaires de la SEP, les observations effectuées dans le cadre de ce projet de recherche ouvrent la voie à des études subséquentes, en augmentant la quantité de données disponibles pour ceux qui désireraient élucider les phénomènes abordés ici.

Les données épidémiologiques obtenues en étudiant les animaux TCR1640 soulignent la grande disparité qui existe entre les mâles et les femelles atteints d'EAE spontanée. Comme ce phénomène reflète en partie la réalité des patients atteints de SEP, ce modèle pourrait être utilisé comme outil afin d'évaluer l'impact de facteurs associés au sexe dans le développement de maladies telles que la SEP ou l'EAE. Des études sur l'influence de différentes hormones dans un contexte neuro-inflammatoire pourraient par exemple bénéficier d'un modèle comme la souris TCR1640. Les modulations de maladies auto-immunes comme la SEP lors de la grossesse pourraient également être étudiées avec ce modèle.

Les événements qui déclenchent ou qui modulent les poussées et les rémissions en SEP de forme cyclique restent à ce jour mal compris. Les raisons pour lesquelles les souris de souche SJL développent de façon préférentielle une forme cyclique d'EAE, tandis que d'autres souches murines développent une maladie progressive, restent également nébuleuses. Une étude cinétique approfondie des phénomènes moléculaires et systémiques survenant à différents stades de la maladie chez les animaux atteints d'EAE spontanée pourrait apporter des informations sur ce sujet. En catégorisant minutieusement les symptômes des animaux, une étude similaire à celle effectuée ici, mais de plus grande envergure, pourrait comparer des souris en début de poussée, au point culminant d'un épisode, en rémission, lors d'un second épisode, etc. Cette plus grande précision dans la sélection des groupes expérimentaux pourrait mettre à jour des phénomènes subtils qui passent inaperçus dans notre analyse.



Les observations effectuées *in situ* chez les animaux présymptomatiques sont particulièrement intéressantes, puisque les événements pathologiques qui précèdent l'apparition des symptômes prennent place sur une période de temps beaucoup plus longue que dans un modèle d'EAE actif, où la paralysie apparaît quelques jours après l'immunisation active ou passive des animaux<sup>172</sup>.

Certaines différences ont été observées ici entre les animaux présymptomatiques âgés de 35 jours et les animaux WT; notons la présence d'une plus grande quantité de macrophages périvasculaires, ainsi qu'une augmentation de l'astroglie et de l'expression de la molécule VCAM-1. Néanmoins, l'activation microgliale à 35 jours n'est pas différente chez les souris TCR1640 et les animaux WT. La quantité de fibrinogène présente dans le parenchyme cérébral est également minime. Ces animaux ne présentent pas non plus d'infiltration de lymphocytes T CD4+. On peut supposer que l'arrivée de ces cellules auxiliaires correspond à l'obtention d'un milieu suffisamment inflammatoire pour causer l'apparition de symptômes cliniques. La capacité du fibrinogène à déclencher l'activation microgliale au sein du SNC a récemment été identifiée<sup>106</sup>. Ceci peut expliquer l'activation tardive de la microglie, qui survient lorsque la perméabilité de la BHE augmente de façon marquée et permet l'extravasation de quantités importantes de fibrinogène. L'activation microgliale est également influencée par la présence de leucocytes dans le parenchyme cérébral. Cependant, les animaux présymptomatiques présentent un accroissement du nombre de cellules immunitaires uniquement dans l'espace périvasculaire. Ces cellules sont alors toujours contenues à l'intérieur de la membrane basale, et ne peuvent donc pas activer la microglie par contact direct.

Ces observations sont pour l'instant très sommaires, puisqu'elles ont été effectuées sur un très petit nombre d'animaux (n = 3 animaux par groupe) et ne sont pour l'instant que qualitatives. La variation de l'expression des différents marqueurs étudiés ici *in situ* devra être vérifiée et quantifiée (par PCR quantitatif ou par immunobuvardage, par exemple). Ces résultats ouvrent la voie à une étude de la cinétique des changements qui surviennent à la BHE dans ce modèle d'EAE spontanée. Une étude plus approfondie de la progression de l'inflammation au sein du SNC chez les animaux TCR1640 présymptomatiques a d'ailleurs été réalisée, en utilisant des animaux âgés de 35 à 50 jours (données non présentées). Il vaudrait la peine de poursuivre des études chez des animaux plus jeunes encore, afin de

s'attarder sur la cause des changements observés au sein du parenchyme cérébral : les modifications précoces de l'UNV dans ce modèle d'EAE spontanée sont-elles liées à l'arrivée de quelques leucocytes dans l'espace périvasculaire, ou, au contraire, précèdent-elles l'infiltration immunitaire ? Si ce deuxième scénario est vrai, quelle est alors la cause initiale de ces changements ? Les animaux TCR1640 ne présentant aucune autre mutation que l'expression de leur TCR transgénique, les propriétés de base de la BHE et de l'UNV ne devraient pas être altérées. Rappelons ici que les résultats obtenus par cytométrie de flux pour l'expression des cytokines IFN $\gamma$  et IL-17 montrent une augmentation du pourcentage de cellules qui expriment ces cytokines proinflammatoires dans les organes lymphoïdes secondaires des animaux TCR1640 présymptomatiques. L'activation précoce de ces cellules est-elle constitutive, ou survient-elle à la suite d'un évènement précis, qui prend place en périphérie ou dans le SNC ? L'étude approfondie du système immunitaire chez les animaux plus jeunes permettra peut-être de répondre à ces questions.

Les observations faites chez les animaux présymptomatiques suggèrent que des phénomènes pathologiques prennent place très tôt chez ces animaux, bien avant l'apparition de symptômes cliniques. Ces manifestations pathologiques présymptomatiques sont très diversifiées : dans le SNC, on constate une augmentation de la population de macrophages périvasculaires, une augmentation de l'astrogliose et une augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1, tandis qu'une augmentation dans le pourcentage de cellules produisant les cytokines pro-inflammatoires IFN $\gamma$  et IL-17 survient en périphérie. De plus, ces phénomènes ont été observés dans toutes les souris étudiées (n = 3 animaux pour la caractérisation *in situ*; n = 4 animaux pour la cytométrie), bien que l'incidence de l'EAE chez les femelles TCR1640 de notre colonie ne soit que de 81 %. Ces résultats soulèvent des questions qui sont directement liées à l'étiologie de la SEP : dans une population en apparence homogène et exposée à un environnement commun, quels sont les facteurs qui enclenchent chez certains l'apparition de la maladie, et, réciproquement, quels sont les facteurs qui protègent les individus sains ?

Les phénomènes pathologiques identifiés lors de l'observation *in situ* de l'UNV chez les animaux TCR1640 ont déjà été caractérisés de façon extensive par l'étude de tissus provenant de patients atteints de SEP ou d'animaux souffrant d'EAE. L'intérêt de ces résultats

n'est donc pas de savoir, par exemple, que l'infiltration périvasculaire survient de façon concomitante à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1, ou à la déstructuration des JS, telle qu'illustrée par le marquage pour JAM-A. Ces observations nous confirment cependant que l'infiltration des cellules immunitaires dans le modèle TCR1640 est accompagnée des phénomènes inflammatoires attendus. Il est toutefois intéressant de comparer l'étendue des dommages causés à l'UNV aux différents stades actifs de la maladie.

Deux observations particulièrement intéressantes distinguent la phase aiguë et la phase chronique dans notre étude. Tout d'abord, la quantité de cellules immunitaires présentes dans le parenchyme cérébral est beaucoup plus importante chez les animaux en phase chronique. Cette observation, faite d'abord *in situ*, a également été validée par l'analyse en cytométrie de flux. C'est peut-être ce phénomène qui explique le maintien d'un environnement hautement inflammatoire à ce stade de la maladie. Notons l'activation microgliale et astrocytaire extensive, qui est beaucoup plus importante que dans la phase aiguë de l'EAE spontanée. Ces résultats viennent un peu à l'encontre de l'idée largement répandue que les processus inflammatoires s'épuisent graduellement, et sont remplacés par des phénomènes de neurodégénérescence dans la phase chronique de maladies neuro-immunes<sup>173, 174</sup>. Bien qu'une certaine régulation leucocytaire soit sans aucun doute en place (comme le suggère l'enrichissement en cellules T régulatrices chez les animaux chroniques), les lymphocytes T présents dans le tissu ont encore un phénotype proinflammatoire, comme le démontre le maintien de l'expression de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-17 dans le SNC de ces animaux. La présence de quantités importantes de ces cytokines explique en partie l'activation des cellules gliales au sein du parenchyme cérébral des animaux chroniques, puisque l'IL-17 et l'IFN $\gamma$  peuvent agir directement sur les astrocytes et les microglies<sup>175</sup>. Elles stimulent notamment la production de MMP (MMP-2 et MMP-9), et contribuent au maintien de la réponse inflammatoire. Ceci suggère un échec des lymphocytes T régulateurs présents à contrôler efficacement l'activation des cellules immunitaires effectrices. L'étude de l'expression de cytokines associées au profil humoral et immunomodulateur T<sub>H</sub>2, telles que l'IL-4 et l'IL-10, permettrait d'avoir une vue d'ensemble sur l'orientation préférentielle de la réponse des cellules T auxiliaires à différents stades de la maladie.

Le deuxième phénomène qui différencie les animaux en phases aiguë et chronique réside dans la présence intravasculaire de fibrinogène. En effet, la présence accrue de fibrinogène dans le parenchyme cérébral des animaux chroniques est peu surprenante, compte tenu de l'état hautement inflammatoire de l'UNV chez ces animaux. Cependant, le marquage très présent du fibrinogène à l'intérieur des vaisseaux sanguins dans les animaux présymptomatiques et en phase aiguë est diminué lors de la phase chronique. Ce phénomène reflète peut-être une diminution de l'efficacité de la perfusion cérébrale locale, associée à la neurodégénérescence causée par le maintien prolongé d'un environnement hautement inflammatoire dans le SNC. Comme présenté précédemment, l'UNV est un microenvironnement délicat, qui permet, entre autres, la régulation fine de la perfusion cérébrale, via les informations transmises par les astrocytes et les neurones du parenchyme avoisinant. La présence prolongée de cellules infiltrantes à l'intérieur de cet environnement et les phénomènes pathologiques qui y sont associés (notamment, l'astrogliose et la perturbation de la transmission neuronale suite à la perte de la gaine de myéline des axones) causent une perturbation dans l'apport sanguin adéquat au parenchyme cérébral. Notamment, l'expression de ROS par les cellules infiltrantes contribue à la diminution de la perfusion cérébrale<sup>176</sup>. Cette hypoperfusion, combinée à la désorganisation des échanges contrôlés par la BHE, contribue vraisemblablement à la neurodégénérescence qui survient dans les stades tardifs de maladies telles que l'EAE ou la SEP.

Il est également intéressant de souligner que le nombre absolu de leucocytes dans le SNC n'est pas significativement plus élevé chez les animaux en phase aiguë d'EAE spontanée, par rapport aux animaux présymptomatiques. Cependant, les lymphocytes T des animaux en phase aiguë semblent plus activés par rapport à ceux des animaux présymptomatiques dans le SNC, comme le démontre le nombre absolu de cellules T qui expriment l'IFN $\gamma$  et l'IL-17. Ceci suggère que ce n'est pas l'infiltration massive de cellules immunitaires qui déclenche la maladie, mais peut-être uniquement une activation plus importante des leucocytes infiltrants. Les différences en ce qui concernent l'activation périphérique des lymphocytes T entre le stade présymptomatique et le stade aigu ne sont cependant pas significatives. Ces observations nous ramènent aux questions abordées plus haut : quel est le seuil d'activation immunitaire

cérébrale qui correspond au déclenchement clinique de l'EAE spontanée, et à quels phénomènes immunitaires ou neurologiques l'atteinte de ce seuil est-elle liée ?

Une étude approfondie, utilisant des animaux à une plus grande variété de stades pathologiques (particulièrement chez les animaux en rémission), permettra un plus grand éventail d'observations. Notons que nous nous sommes limités ici à la caractérisation *in situ* des événements pathologiques qui surviennent dans le cerveau, et que nous avons mis de côté la présentation des données dans la moelle épinière. Il est important de souligner que les animaux TCR1640 malades présentent une inflammation massive de la moelle épinière (données non présentées). Il faut également rappeler que l'EAE et la SEP étant caractérisées par l'apparition d'un grand nombre de lésions inflammatoires démyélinisantes au sein du SNC, il peut être difficile de témoigner par des observations *in situ* de phénomènes qui reflètent le stade clinique de la maladie. En effet, l'apparition d'une lésion n'entraîne pas nécessairement de symptômes, et des attaques inflammatoires peuvent survenir même lors d'une phase clinique de rémission ou de stabilisation des symptômes<sup>177</sup>.

L'établissement du profil immunitaire des animaux TCR1640 par cytométrie de flux a permis de mettre en lumière certaines particularités de ce modèle. La différence la plus frappante entre les souris transgéniques et leurs consœurs WT réside dans la diminution, autant en pourcentage qu'en nombre absolu, de la population de lymphocytes T en périphérie. Rappelons cependant que 99 % des cellules T des animaux TCR1640 portent un TCR autoréactif, reconnaissant un peptide endogène du SNC<sup>165</sup>. Il est donc possible que certaines de ces cellules soient éliminées dans le thymus lors de leur développement, si elles interagissent trop fortement avec les cellules dendritiques et les épithéliales thymiques permettant la sélection négative d'un répertoire de lymphocytes T adéquat. Cette hypothèse est supportée par l'observation, chez plusieurs souris TCR1640 adultes, d'un thymus hypertrophié (données non présentées).

Cependant, ceci n'explique pas la diminution plus marquée dans la population de lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) par rapport aux lymphocytes T auxiliaires (CD4+), et ce, même dans le SNC d'animaux malades (par rapport à leurs consœurs WT). Rappelons ici que la différence majeure dans l'activation des lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques réside

dans l'interaction entre le TCR du lymphocyte et le CMH de la CPA. En effet, les lymphocytes T cytotoxiques nécessitent une interaction avec le CMH de classe I, tandis que les lymphocytes T auxiliaires interagissent avec le CMH de classe II pour être activés. Comme le TCR transgénique exprimé par les souris TCR1640 a été isolé à partir d'une cellule T auxiliaire, les cellules T ont probablement une affinité accrue pour le CMH de classe II, par rapport au CMH de classe I, dans ce modèle. Les cellules T arrivant néanmoins à se différencier en lymphocytes T cytotoxiques présentent probablement une affinité accrue pour le peptide de la myéline présenté par le CMH de classe I, ce qui explique leur profil hautement inflammatoire.

L'analyse de l'expression des cytokines proinflammatoires IL-17 et IFN $\gamma$  apporte quelques précisions quant à la caractérisation des sous-populations lymphocytaires dans le modèle TCR1640. Il est important de souligner l'absence d'une population clairement définie de cellules exprimant à la fois l'IFN $\gamma$  et l'IL-17 (données non présentées), puisque ces cellules ont été identifiées comme hautement pathogènes dans la SEP et différents modèles d'EAE<sup>178</sup>. On remarque un enrichissement dans l'expression de l'IL-17 par les lymphocytes auxiliaires (CD4+) du SNC en phase chronique, tandis que l'IFN $\gamma$  semble majoritairement produit par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) en périphérie dans les stades présymptomatique et aigu de la maladie. L'expression élevée des cytokines proinflammatoires dans le SNC des animaux WT s'explique aisément. En effet, même si ces animaux ne sont pas malades, les leucocytes qui sont présents dans le tissu cérébral sont activés suite à leur interaction avec la BHE afin d'assurer la surveillance immunitaire.

En raison du profil d'expression de ces cytokines proinflammatoires, on peut suggérer l'hypothèse suivante : les lymphocytes T cytotoxiques jouent un rôle en périphérie dans le déclenchement de l'EAE spontanée via la production de l'IFN $\gamma$ , tandis que les lymphocytes T auxiliaires participent au maintien de la réponse inflammatoire après le déclenchement de la maladie en sécrétant de l'IL-17 au sein du parenchyme cérébral. Ces deux populations pourraient donc intervenir dans la régulation de phénomènes précis dans le développement ou le maintien de l'EAE spontanée. Évidemment, les résultats présentés ici ne permettent pas de

valider cette hypothèse. Cependant, une caractérisation plus poussée de ces sous-types de lymphocytes pourrait préciser le rôle de ceux-ci dans l'EAE spontanée.

Enfin, l'étude de différentes CAM a également permis de souligner quelques particularités du système immunitaire du modèle TCR1640. Tout d'abord, l'étude de VLA-4 a démontré que l'augmentation de l'expression de cette molécule n'était pas fortement associée au profil des souris TCR1640. VLA-4 est plus fortement exprimée par les lymphocytes T, en périphérie chez les souris présymptomatiques et dans le SNC des animaux en phase active d'EAE spontanée (plus fortement en phase chronique). Cependant, ces différences ne sont pas significatives pour tous les groupes expérimentaux (par exemple, il n'y a pas de différence dans le pourcentage de lymphocytes T auxiliaires qui expriment VLA-4 dans le SNC de souris en phase aiguë par rapport aux souris WT).

Ces résultats peuvent en partie expliquer l'efficacité modérée du traitement avec l'anticorps anti-VLA-4 dans ce modèle. En effet, bien que le traitement bloquant VLA-4 ait permis de retarder de façon significative l'apparition des symptômes d'EAE dans notre modèle de transfert adoptif de lymphocytes T CD4+, les souris traitées ont tout de même développé une maladie aussi sévère et de forme similaire à celle des animaux qui recevaient du PBS. Il est cependant possible que les souris développent une réponse immunitaire neutralisante contre le VLA-4, puisque ce phénomène a été caractérisé chez 5 à 15 % des patients traités au Natalizumab<sup>179</sup>. Il faut néanmoins souligner que cette expérience n'a été réalisée qu'une fois, sur un petit nombre d'animaux (6 souris par groupe). Répéter cette expérience permettrait peut-être de noter une diminution significative dans la sévérité clinique de la maladie lors du traitement avec l'anticorps anti-VLA-4. Enfin, des études utilisant d'autres modèles d'EAE ont également montré une efficacité modérée du traitement bloquant VLA-4.

Ces résultats rappellent que le modèle d'EAE spontanée obtenu dans la colonie TCR1640, bien qu'épidémiologiquement et cliniquement plus proche de la SEP que de l'EAE classique, ne reste qu'un modèle de la maladie, et présente certaines différences avec cette dernière. Cependant, cette première tentative d'application thérapeutique au modèle TCR1640

reste encourageante, puisqu'elle suggère que la maladie développée par ces animaux peut être modulée cliniquement.

La caractérisation de l'expression de MCAM et ALCAM apporte quant à elle des résultats enthousiasmants.

On remarque tout d'abord un enrichissement dans l'expression de MCAM chez les lymphocytes T auxiliaires du SNC. La différence la plus frappante se retrouve néanmoins dans l'augmentation de l'expression de MCAM de près de 20 % par les lymphocytes T cytotoxiques en périphérie. L'enrichissement en MCAM est maintenu dans ces deux populations, peu importe le stade de la maladie. Étant donné l'expression de différentes cytokines proinflammatoires par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ identifiée plus haut, il sera intéressant de faire le profil de sécrétion de différentes cytokines dans ces populations enrichies en MCAM. L'expression de MCAM dans les lymphocytes T auxiliaires a été jusqu'à présent associée à un profil T<sub>H</sub>17, via l'expression d'IL-17, d'IFN $\gamma$  et de GM-CSF<sup>133</sup>. Il sera intéressant de voir si ce profil d'expression est le même dans le modèle TCR1640, puisque la production d'IL-17 est augmentée dans le SNC d'animaux malades atteints d'EAE spontanée. Il est également intéressant de voir MCAM enrichie sur une population de cellules T cytotoxiques, puisque le rôle de cette CAM a été jusqu'à maintenant plutôt associé aux lymphocytes T auxiliaires.

L'enrichissement en ALCAM est, quant à lui, presque exclusivement associé aux cellules présentes dans le SNC des animaux TCR1640. En effet, les différences les plus marquantes dans l'expression de cette molécule se retrouvent au sein des populations de lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans le SNC des animaux en phase aiguë ou chronique d'EAE spontanée. ALCAM n'étant pas très fortement exprimée dans les animaux présymptomatiques, ces résultats suggèrent une implication des lymphocytes auxiliaires et effecteurs exprimant ALCAM dans les processus inflammatoires pathologiques qui surviennent de façon aiguë et chronique dans le parenchyme cérébral des animaux TCR1640. Ici aussi, une caractérisation plus complète de ces cellules exprimant ALCAM permettra d'obtenir plus d'informations sur l'implication réelle de celles-ci dans la physiopathologie de l'EAE spontanée.



En comparant les résultats obtenus par rapport au profil d'expression de VLA-4, MCAM et ALCAM, il est intéressant de constater que l'enrichissement pour ces deux dernières molécules est beaucoup plus net que pour l'intégrine prototypique VLA-4 dans ce modèle d'EAE spontanée. Ces molécules semblent donc impliquées dans le recrutement spécifique de cellules encéphalitogènes chez les souris TCR1640. Ces résultats sont encourageants, puisque MCAM et ALCAM sont actuellement considérées comme cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de l'EAE et de la SEP par notre équipe de recherche. La souris TCR1640 semble être un modèle de choix pour poursuivre la caractérisation descriptive et fonctionnelle de ces deux molécules *in situ*, *in vitro* et *in vivo*.

## Conclusion

En conclusion, ce projet visait à approfondir la caractérisation d'un nouveau modèle d'EAE spontanée, le modèle TCR1640. Un projet de caractérisation comme celui-ci permet d'obtenir beaucoup de résultats, mais soulève également beaucoup de questions, qui sont encore sans réponse. Le modèle TCR1640 est un modèle d'EAE spontanée qui peut sembler difficile à utiliser, à cause de la grande variabilité qui existe entre les animaux en ce qui concerne l'âge d'apparition des symptômes ainsi que l'évolution clinique de la maladie. Paradoxalement, c'est également ce qui fait la force de ce modèle, puisque ce sont ces caractéristiques qui l'apparentent cliniquement beaucoup plus à la SEP que les autres modèles de cette maladie.

L'ensemble des résultats présentés ici a permis d'approfondir notre compréhension du modèle TCR1640, et de valider celui-ci en tant qu'outil expérimental précieux pour l'étude de phénomènes associés à la SEP. Ce modèle présente tout d'abord un avantage important pour l'étude des phénomènes précoces qui surviennent avant l'apparition de symptômes cliniques dans l'EAE spontanée. Ensuite, l'expression des molécules MCAM et ALCAM, étudiées activement dans notre laboratoire, est fortement modifiée dans les animaux TCR1640 par rapport aux souris contrôle. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de recherche lancent donc une nouvelle étape dans la caractérisation du rôle de ces deux molécules dans l'EAE et la SEP. Enfin, une classification plus fine des différents stades de la maladie permettra d'effectuer des études de cinétique élégantes sur la modulation au cours de l'EAE spontanée d'un grand éventail de molécules associées à la physiopathologie de la SEP, dont une petite partie seulement a été étudiée ici.

## Bibliographie

1. Crone C, Olesen SP. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res* 1982, **241**(1): 49-55.
2. Bolz S, Farrell CL, Dietz K, Wolburg H. Subcellular distribution of glucose transporter (GLUT-1) during development of the blood-brain barrier in rats. *Cell Tissue Res* 1996, **284**(3): 355-365.
3. Kissel K, Hamm S, Schulz M, Vecchi A, Garlanda C, Engelhardt B. Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochemistry and cell biology* 1998, **110**(1): 63-72.
4. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, *et al.* Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994, **77**(4): 491-502.
5. Vorbrodth AW. Ultracytochemical characterization of anionic sites in the wall of brain capillaries. *Journal of neurocytology* 1989, **18**(3): 359-368.
6. Engelhardt B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microscopy research and technique* 2001, **52**(1): 112-129.
7. Kniesel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 2000, **20**(1): 57-76.
8. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, **2**(4): 285-293.
9. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, *et al.* Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000, **11**(12): 4131-4142.
10. Balda MS, Flores-Maldonado C, Cerejido M, Matter K. Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *J Cell Biochem* 2000, **78**(1): 85-96.
11. Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *The International journal of developmental biology* 2000, **44**(6): 743-748.
12. Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD. Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 2000, **275**(25): 19139-19145.
13. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, *et al.* Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998, **142**(1): 117-127.
14. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, *et al.* Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is

- selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* 2003, **105**(6): 586-592.
15. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, *et al.* Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 2003, **161**(3): 653-660.
  16. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 1999, **147**(1): 185-194.
  17. Liebner S, Kniesel U, Kalbacher H, Wolburg H. Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 2000, **79**(10): 707-717.
  18. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998, **141**(7): 1539-1550.
  19. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(2): 511-516.
  20. Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends in cell biology* 1999, **9**(7): 268-273.
  21. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 1999, **147**(4): 891-903.
  22. Miyamori H, Takino T, Kobayashi Y, Tokai H, Itoh Y, Seiki M, *et al.* Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 2001, **276**(30): 28204-28211.
  23. Chretien I, Marcuz A, Courtet M, Katevuo K, Vainio O, Heath JK, *et al.* CTX, a *Xenopus* thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. *Eur J Immunol* 1998, **28**(12): 4094-4104.
  24. Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 2001, **276**(4): 2733-2741.
  25. Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, *et al.* The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 19): 3879-3891.
  26. Nasdala I, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Kuhn A, Ebnet K, Brachtendorf G, *et al.* A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem* 2002, **277**(18): 16294-16303.
  27. Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(26): 15191-15196.
  28. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology* 2002, **38**(6): 323-337.
  29. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Current opinion in cell biology* 1999, **11**(5): 628-633.

30. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, *et al.* Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 1994, **127**(6 Pt 1): 1617-1626.
31. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998, **273**(45): 29745-29753.
32. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999, **147**(6): 1351-1363.
33. Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 1998, **141**(1): 199-208.
34. Leech S, Kirk J, Plumb J, McQuaid S. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007, **33**(1): 86-98.
35. Anderson JM, Balda MS, Fanning AS. The structure and regulation of tight junctions. *Current opinion in cell biology* 1993, **5**(5): 772-778.
36. Van Itallie CM, Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J Cell Sci* 1997, **110** ( Pt 9): 1113-1121.
37. Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, *et al.* Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol* 1999, **162**(5): 3022-3030.
38. Graesser D, Solowiej A, Bruckner M, Osterweil E, Juedes A, Davis S, *et al.* Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J Clin Invest* 2002, **109**(3): 383-392.
39. Dejana E. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 1996, **98**(9): 1949-1953.
40. Liebner S, Gerhardt H, Wolburg H. Differential expression of endothelial beta-catenin and plakoglobin during development and maturation of the blood-brain and blood-retina barrier in the chicken. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2000, **217**(1): 86-98.
41. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Progress in neurobiology* 2002, **68**(5): 311-323.
42. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, *et al.* Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology* 2008, **10**(8): 923-934.
43. Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, *et al.* Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 2003, **42**(3): 235-251.
44. Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 1995, **269**(4 Pt 1): G467-475.
45. Cereijido M, Gonzalez-Mariscal L, Contreras RG, Gallardo JM, Garcia-Villegas R, Valdes J. The making of a tight junction. *Journal of cell science Supplement* 1993, **17**: 127-132.

46. Phelps CH. The development of glio-vascular relationships in the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 1972, **128**(4): 555-563.
47. Goldstein GW. Endothelial cell-astrocyte interactions. A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci* 1988, **529**: 31-39.
48. Wolburg H, Neuhaus J, Kiesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, *et al.* Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 1994, **107** (Pt 5): 1347-1357.
49. Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, *et al.* A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 1991, **115**(6): 1725-1735.
50. Meresse S, Dehouck MP, Delorme P, Bensaid M, Tauber JP, Delbart C, *et al.* Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem* 1989, **53**(5): 1363-1371.
51. Siddharthan V, Kim YV, Liu S, Kim KS. Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res* 2007, **1147**: 39-50.
52. Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, *et al.* SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med* 2003, **9**(7): 900-906.
53. Tran ND, Correale J, Schreiber SS, Fisher M. Transforming growth factor-beta mediates astrocyte-specific regulation of brain endothelial anticoagulant factors. *Stroke* 1999, **30**(8): 1671-1678.
54. Utsumi H, Chiba H, Kamimura Y, Osanai M, Igarashi Y, Tobioka H, *et al.* Expression of GFRalpha-1, receptor for GDNF, in rat brain capillary during postnatal development of the BBB. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **279**(2): C361-368.
55. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moumdjian R, *et al.* Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci* 2007, **27**(34): 9032-9042.
56. Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 2001, **36**(2): 145-155.
57. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006, **7**(1): 41-53.
58. Zhang W, Smith C, Howlett C, Stanimirovic D. Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1beta. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000, **20**(6): 967-978.
59. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 2006, **1**(3): 223-236.
60. Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques* 2003, **61**: 39-78.
61. de Boer AG, van der Sandt IC, Gaillard PJ. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2003, **43**: 629-656.

62. Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol* 2007, **17**(2): 243-250.
63. Sasaki A, Sasaki K, Konttinen YT, Santavirta S, Takahara M, Takei H, *et al.* Hyaluronate inhibits the interleukin-1beta-induced expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 in human synovial cells. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2004, **204**(2): 99-107.
64. Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 1998, **53**(6): 637-644.
65. Kamouchi M, Ago T, Kitazono T. Brain Pericytes: Emerging Concepts and Functional Roles in Brain Homeostasis. *Cell Mol Neurobiol* 2010.
66. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 2010, **468**(7323): 562-566.
67. Dore-Duffy P. Isolation and characterization of cerebral microvascular pericytes. *Methods in molecular medicine* 2003, **89**: 375-382.
68. Lou HC, Edvinsson L, MacKenzie ET. The concept of coupling blood flow to brain function: revision required? *Ann Neurol* 1987, **22**(3): 289-297.
69. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2004, **5**(5): 347-360.
70. Golanov EV, Yamamoto S, Reis DJ. Spontaneous waves of cerebral blood flow associated with a pattern of electrocortical activity. *Am J Physiol* 1994, **266**(1 Pt 2): R204-214.
71. Golanov EV, Reis DJ. Cerebral cortical neurons with activity linked to central neurogenic spontaneous and evoked elevations in cerebral blood flow. *Neurosci Lett* 1996, **209**(2): 101-104.
72. Hamel E. Cholinergic modulation of the cortical microvascular bed. *Prog Brain Res* 2004, **145**: 171-178.
73. Ponomarev ED, Shriver LP, Dittel BN. CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. *J Immunol* 2006, **176**(3): 1402-1410.
74. Pachter JS, de Vries HE, Fabry Z. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003, **62**(6): 593-604.
75. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 1994, **180**(2): 631-640.
76. Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 1998, **86**(4): 1245-1257.
77. Juhler M, Blasberg RG, Fenstermacher JD, Patlak CS, Paulson OB. A spatial analysis of the blood-brain barrier damage in experimental allergic encephalomyelitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985, **5**(4): 545-553.
78. Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2005, **26**(9): 485-495.

79. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(9): 678-689.
80. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, *et al.* Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol* 2002, **168**(4): 1940-1949.
81. Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, **58**(2): 138-152.
82. Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 2006, **113**(4): 477-485.
83. Prat A, Biernacki K, Lavoie JF, Poirier J, Duquette P, Antel JP. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch Neurol* 2002, **59**(3): 391-397.
84. Greenwood J, Wang Y, Calder VL. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology* 1995, **86**(3): 408-415.
85. Devine L, Lightman SL, Greenwood J. Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers in vitro. *Immunology* 1996, **88**(3): 456-462.
86. Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol* 2006, **80**(4): 714-718.
87. Ifergan I, Kebir H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, *et al.* The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain* 2008, **131**(Pt 3): 785-799.
88. Engelhardt B, Conley FK, Butcher EC. Cell adhesion molecules on vessels during inflammation in the mouse central nervous system. *J Neuroimmunol* 1994, **51**(2): 199-208.
89. Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett* 2011, **585**(23): 3770-3780.
90. Kallmann BA, Wagner S, Hummel V, Buttmann M, Bayas A, Tonn JC, *et al.* Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells. *FASEB J* 2002, **16**(6): 589-591.
91. Wosik K, Biernacki K, Khouzam MP, Prat A. Death receptor expression and function at the human blood brain barrier. *J Neurol Sci* 2007, **259**(1-2): 53-60.
92. Wei YP, Kita M, Shinmura K, Yan XQ, Fukuyama R, Fushiki S, *et al.* Expression of IFN-gamma in cerebrovascular endothelial cells from aged mice. *J Interferon Cytokine Res* 2000, **20**(4): 403-409.
93. Ruprecht K, Kuhlmann T, Seif F, Hummel V, Kruse N, Bruck W, *et al.* Effects of oncostatin M on human cerebral endothelial cells and expression in inflammatory brain lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001, **60**(11): 1087-1098.



94. Wong D, Dorovini-Zis K. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 1992, **39**(1-2): 11-21.
95. Wong D, Dorovini-Zis K. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Microvasc Res* 1995, **49**(3): 325-339.
96. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, *et al.* Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010, **467**(7318): 967-971.
97. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**: 485-517.
98. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005, **201**(2): 233-240.
99. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, *et al.* Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 2010, **24**(4): 1023-1034.
100. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007, **13**(10): 1173-1175.
101. Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S. Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2008, **444**(2): 195-198.
102. Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y. Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. *J Leukoc Biol* 2005, **78**(6): 1223-1232.
103. Lee H, Kim HJ, Kim JM, Chang N. Effects of dietary folic acid supplementation on cerebrovascular endothelial dysfunction in rats with induced hyperhomocysteinemia. *Brain Res* 2004, **996**(2): 139-147.
104. Van der Goes A, Wouters D, Van Der Pol SM, Huizinga R, Ronken E, Adamson P, *et al.* Reactive oxygen species enhance the migration of monocytes across the blood-brain barrier in vitro. *FASEB J* 2001, **15**(10): 1852-1854.
105. Kim SR, Bae YH, Bae SK, Choi KS, Yoon KH, Koo TH, *et al.* Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2008, **1783**(5): 886-895.
106. Ryu JK, Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *J Thromb Haemost* 2009, **7 Suppl 1**: 151-154.
107. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 2006, **12**(9): 1005-1015.
108. Nag S, Takahashi JL, Kilty DW. Role of vascular endothelial growth factor in blood-brain barrier breakdown and angiogenesis in brain trauma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997, **56**(8): 912-921.
109. Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 1999, **399**(6738 Suppl): A40-47.
110. Renoux C. Natural history of multiple sclerosis: long-term prognostic factors. *Neurol Clin* 2011, **29**(2): 293-308.

111. Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* 2006, **19**(3): 248-254.
112. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain* 2010, **133**(Pt 7): 1869-1888.
113. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007, **61**(4): 288-299.
114. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* 2007, **61**(6): 504-513.
115. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, *et al*. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007, **357**(9): 851-862.
116. Grau-Lopez L, Raich D, Ramo-Tello C, Naranjo-Gomez M, Davalos A, Pujol-Borrell R, *et al*. Myelin peptides in multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews* 2009, **8**(8): 650-653.
117. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006, **354**(9): 942-955.
118. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007, **8**(9): 913-919.
119. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000, **343**(13): 938-952.
120. Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, Beyene J. Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* 2012, **12**: CD006921.
121. Kraus J, Voigt K, Schuller AM, Scholz M, Kim KS, Schilling M, *et al*. Interferon-beta stabilizes barrier characteristics of the blood-brain barrier in four different species in vitro. *Mult Scler* 2008, **14**(6): 843-852.
122. Engelhardt B, Kappos L. Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *Neuro-degenerative diseases* 2008, **5**(1): 16-22.
123. Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nature reviews Drug discovery* 2005, **4**(6): 510-518.
124. Ransohoff RM. Natalizumab and PML. *Nat Neurosci* 2005, **8**(10): 1275.
125. Engelhardt B, Briskin MJ. Therapeutic targeting of alpha 4-integrins in chronic inflammatory diseases: tipping the scales of risk towards benefit? *Eur J Immunol* 2005, **35**(8): 2268-2273.
126. Chiba K, Adachi K. Discovery of fingolimod, the sphingosine 1-phosphate receptor modulator and its application for the therapy of multiple sclerosis. *Future medicinal chemistry* 2012, **4**(6): 771-781.
127. Bluml S, McKeever K, Ettinger R, Smolen J, Herbst R. B-cell targeted therapeutics in clinical development. *Arthritis research & therapy* 2013, **15 Suppl 1**: S4.
128. Kitsos DK, Tsiodras S, Stamboulis E, Voumvourakis KI. Rituximab and multiple sclerosis. *Clinical neuropharmacology* 2012, **35**(2): 90-96.
129. Sers C, Kirsch K, Rothbacher U, Riethmuller G, Johnson JP. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**(18): 8514-8518.

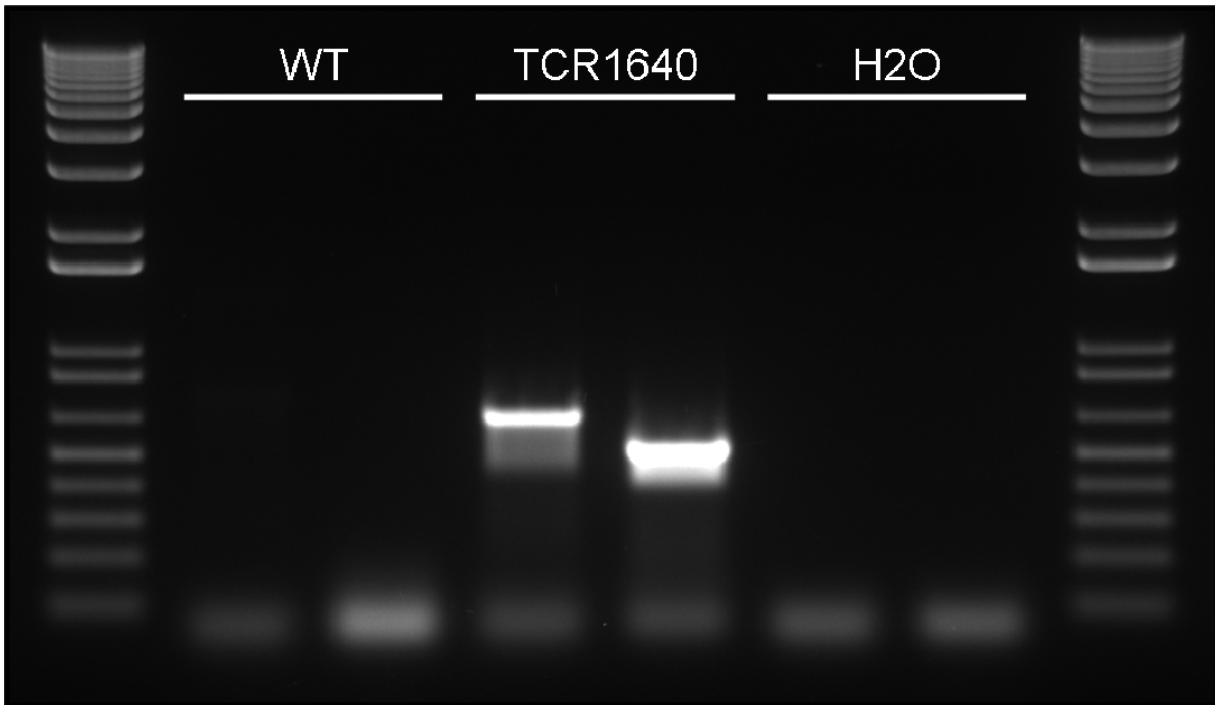
130. Dagur PK, Biancotto A, Wei L, Nida Sen H, Yao M, Strober W, *et al.* MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2011.
131. Mills L, Tellez C, Huang S, Baker C, McCarty M, Green L, *et al.* Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res* 2002, **62**(17): 5106-5114.
132. Bu P, Gao L, Zhuang J, Feng J, Yang D, Yan X. Anti-CD146 monoclonal antibody AA98 inhibits angiogenesis via suppression of nuclear factor-kappaB activation. *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(11): 2872-2878.
133. Larochelle C, Cayrol R, Kebir H, Alvarez JI, Lecuyer MA, Ifergan I, *et al.* Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* 2012, **135**(Pt 10): 2906-2924.
134. Zimmerman AW, Joosten B, Torensma R, Parnes JR, van Leeuwen FN, Figdor CG. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* 2006, **107**(8): 3212-3220.
135. Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 2002, **81**(6): 313-321.
136. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 2008, **9**(2): 137-145.
137. Becher B, Bechmann I, Greter M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2006, **84**(7): 532-543.
138. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996, **85**(3): 299-302.
139. Adams RD, Kubik CS. The morbid anatomy of the demyelinating disease. *Am J Med* 1952, **12**(5): 510-546.
140. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(11): 904-912.
141. Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1971, **1**(4): 242-248.
142. Lublin FD, Lavasa M, Viti C, Knobler RL. Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. *Clin Immunol Immunopathol* 1987, **45**(1): 122-128.
143. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992, **356**(6364): 63-66.
144. Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, *et al.* Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 2000, **6**(10): 1167-1175.
145. van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blumberg BM, *et al.* Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis

- patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 1996, **47**(6): 1531-1534.
146. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 1995, **25**(7): 1951-1959.
  147. Zamvil SS, Mitchell DJ, Moore AC, Kitamura K, Steinman L, Rothbard JB. T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* 1986, **324**(6094): 258-260.
  148. Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol* 1989, **124**(1): 132-143.
  149. Tuohy VK, Thomas DM. Sequence 104-117 of myelin proteolipid protein is a cryptic encephalitogenic T cell determinant for SJL/J mice. *J Neuroimmunol* 1995, **56**(2): 161-170.
  150. Kuchroo VK, Sobel RA, Laning JC, Martin CA, Greenfield E, Dorf ME, *et al.* Experimental allergic encephalomyelitis mediated by cloned T cells specific for a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. Fine specificity and T cell receptor V beta usage. *J Immunol* 1992, **148**(12): 3776-3782.
  151. Greer JM, Klinguer C, Trifilieff E, Sobel RA, Lees MB. Encephalitogenicity of murine, but not bovine, DM20 in SJL mice is due to a single amino acid difference in the immunodominant encephalitogenic epitope. *Neurochemical research* 1997, **22**(4): 541-547.
  152. Krishnamoorthy G, Wekerle H. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol* 2009, **39**(8): 2031-2035.
  153. Krishnamoorthy G, Holz A, Wekerle H. Experimental models of spontaneous autoimmune disease in the central nervous system. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2007, **85**(11): 1161-1173.
  154. Huseby ES, Ohlen C, Goverman J. Cutting edge: myelin basic protein-specific cytotoxic T cell tolerance is maintained in vivo by a single dominant epitope in H-2k mice. *J Immunol* 1999, **163**(3): 1115-1118.
  155. Pearson CI, van Ewijk W, McDevitt HO. Induction of apoptosis and T helper 2 (Th2) responses correlates with peptide affinity for the major histocompatibility complex in self-reactive T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1997, **185**(4): 583-599.
  156. Mendel I, Natarajan K, Ben-Nun A, Shevach EM. A novel protective model against experimental allergic encephalomyelitis in mice expressing a transgenic TCR-specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neuroimmunol* 2004, **149**(1-2): 10-21.
  157. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 2003, **197**(9): 1073-1081.
  158. Arbour N, Holz A, Sipe JC, Nanche D, Romine JS, Zyroff J, *et al.* A new approach for evaluating antigen-specific T cell responses to myelin antigens during the course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003, **137**(1-2): 197-209.

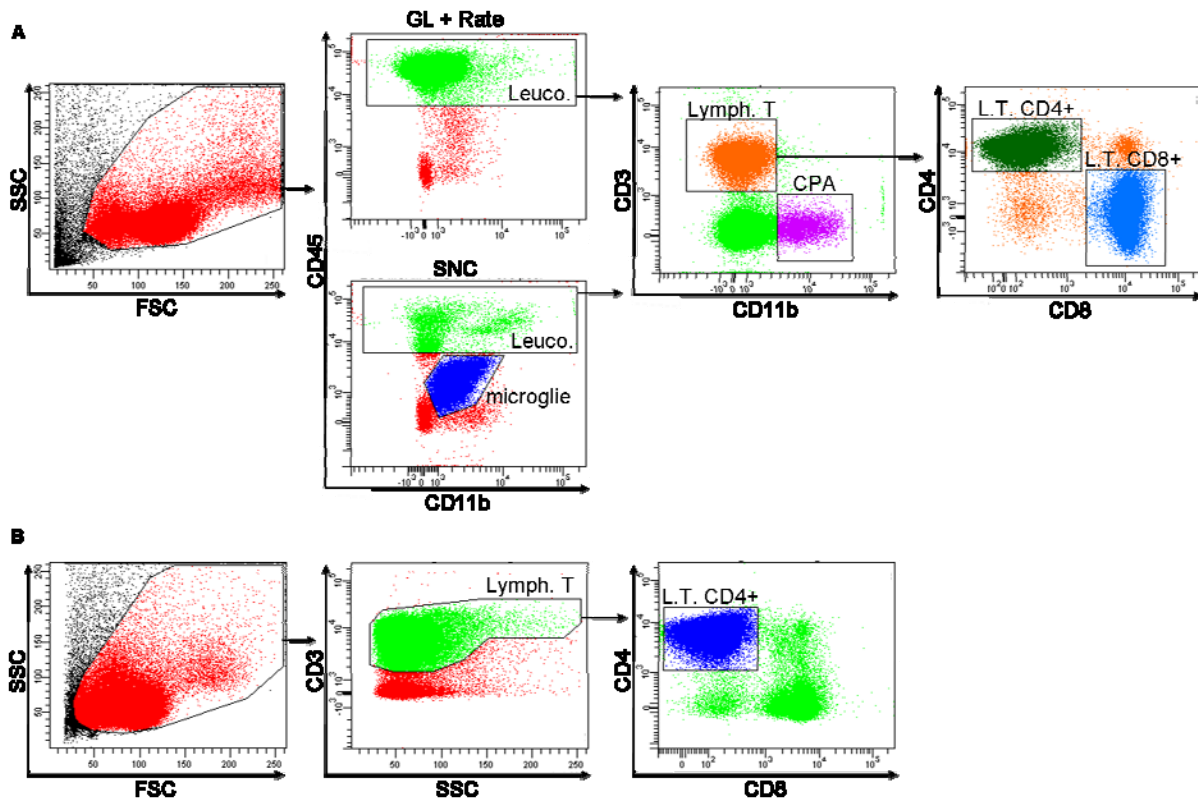
159. Banwell B, Bar-Or A, Cheung R, Kennedy J, Krupp LB, Becker DJ, *et al.* Abnormal T-cell reactivities in childhood inflammatory demyelinating disease and type 1 diabetes. *Ann Neurol* 2008, **63**(1): 98-111.
160. Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, *et al.* A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nature genetics* 1999, **23**(3): 343-347.
161. Ellmerich S, Takacs K, Mycko M, Waldner H, Wahid F, Boyton RJ, *et al.* Disease-related epitope spread in a humanized T cell receptor transgenic model of multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2004, **34**(7): 1839-1848.
162. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine* 2001, **7**(3): 115-121.
163. von Budingen HC, Bar-Or A, Zamvil SS. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Current opinion in immunology* 2011, **23**(6): 713-720.
164. Litzemberger T, Fassler R, Bauer J, Lassmann H, Lington C, Wekerle H, *et al.* B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* 1998, **188**(1): 169-180.
165. Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bosl MR, Dunn R, *et al.* Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med* 2009, **206**(6): 1303-1316.
166. Kluver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1953, **12**(4): 400-403.
167. Leenen PJ, de Bruijn MF, Voerman JS, Campbell PA, van Ewijk W. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1994, **174**(1-2): 5-19.
168. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research* 2000, **25**(9-10): 1439-1451.
169. Kaminski DA, Stavnezer J. Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *International Immunology* 2007, **19**(4): 545-556.
170. Sadlon TJ, Wilkinson BG, Pederson S, Brown CY, Bresatz S, Gargett T, *et al.* Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *J Immunol* 2010, **185**(2): 1071-1081.
171. Theien BE, Vanderlugt CL, Nickerson-Nutter C, Cornebise M, Scott DM, Perper SJ, *et al.* Differential effects of treatment with a small-molecule VLA-4 antagonist before and after onset of relapsing EAE. *Blood* 2003, **102**(13): 4464-4471.
172. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols* 2006, **1**(4): 1810-1819.
173. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJ. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci* 2012, **13**(7): 507-514.
174. Luessi F, Siffrin V, Zipp F. Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies. *Expert Rev Neurother* 2012, **12**(9): 1061-1076; quiz 1077.
175. Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, *et al.* Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol* 2008, **194**(1-2): 54-61.

176. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in neurological disorders. *Can J Physiol Pharmacol* 2009, **87**(8): 581-594.
177. Barkhof F. The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Curr Opin Neurol* 2002, **15**(3): 239-245.
178. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, *et al.* Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009, **66**(3): 390-402.
179. Vennegoor A, Rispens T, Strijbis EM, Seewann A, Uitdehaag BM, Balk LJ, *et al.* Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013, **19**(5): 593-600.

## Annexe – Figures et tableaux supplémentaires

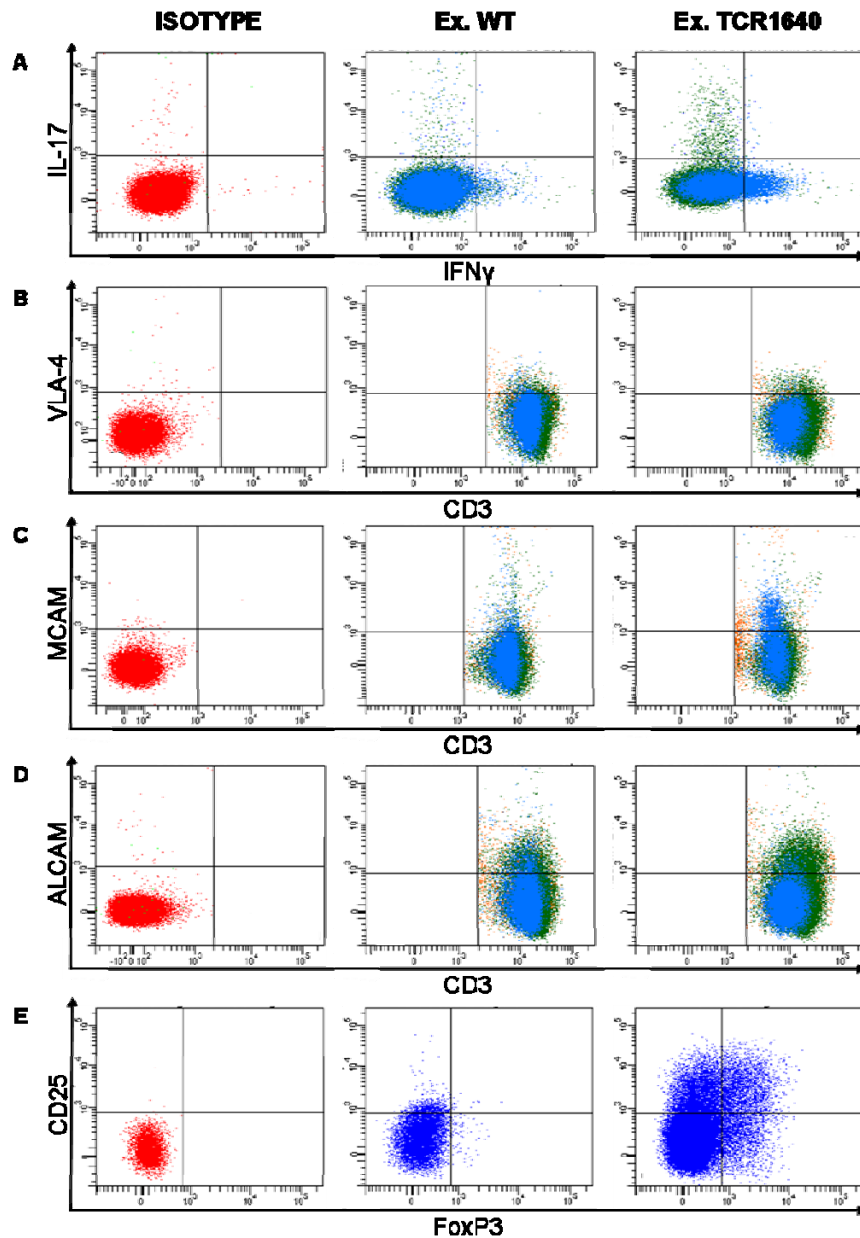


**Figure S1. Génotypage des animaux TCR1640.** Exemple de résultat obtenu par PCR pour le génotypage de deux animaux de la colonie TCR1640. Les échantillons sont analysés suite à la migration sur un gel d'agarose 1,6 %. Les bandes de chaque côté représentent l'échelle de poids moléculaire utilisée pour vérifier la taille de la séquence génique amplifiée. Une souris WT ne présente aucune bande (puits de gauche). Une souris TCR1640 présente deux séquences géniques amplifiées (puits du centre); la plus haute correspond à la chaîne  $\alpha$  du TCR transgénique (650 paires de bases) et la plus basse à la chaîne  $\beta$  (500 paires de bases). Les puits de droite contiennent le contrôle négatif, dans lequel l'échantillon d'ADN est remplacé par de l'eau.



**Figure S2. Stratégie d'analyse pour l'identification des populations leucocytaires étudiées.** Lors de l'analyse par cytométrie de flux, la stratégie d'analyse présentée en (A) a permis de distinguer les populations leucocytaires suivantes : leucocytes totaux (Leuco.) CD45<sup>hi</sup>, lymphocytes T (Lymph. T) CD3<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, cellules présentatrices d'antigènes (CPA) CD11b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, lymphocytes T (L.T.) auxiliaires CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et L.T. cytotoxiques CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>. Cette stratégie d'analyse a été utilisée pour l'étude de l'expression de toutes les molécules étudiées (IFN $\gamma$ , IL-17, VLA-4, MCAM, ALCAM), sauf pour les populations de cellules T régulatrices. Le marquage de cette population de lymphocytes nécessitant un plus grand nombre d'anticorps, une méthode d'analyse plus simple a été utilisée (B). *Légende* : FSC = *Forward Scatter*; SSC = *Side Scatter*.





**Figure S3. Stratégie d'analyse par quadrant pour la quantification de l'expression des molécules à l'étude.** Voici un exemple de l'analyse par quadrant utilisée pour la quantification de l'expression de chacune des molécules analysées lors de cette étude. L'exemple a été appliqué sur une population de lymphocytes T (CD3+). La colonne de gauche représente le ou les isotype(s) approprié(s) pour chacun des anticorps utilisés. La colonne du centre et la colonne de droite représentent un exemple de marquage spécifique et le quadrant qui lui a été appliqué pour une souris WT et une souris TCR1640 malade (phase aiguë ou chronique). (A) co-marquage pour IFN $\gamma$  et IL-17; (B) marquage pour VLA-4; (C) marquage pour MCAM; (D) marquage pour ALCAM; (E) co-marquage pour CD25 et FoxP3.

**Tableau S1 : Anticorps utilisés pour l'immunohistofluorescence**

<b>Anticorps primaire (copmpagnie, # cat.), concentration utilisée</b>	<b>Anticorps secondaire-fluorochrome (compagnie, # cat.), concentration utilisée</b>
Laminine (Dako, Z 0097), 1/1500	Âne anti-lapin-RRX (Jackson ImmunoResearch, 711-295-152), 1/500
Fibrinogène (Innovative Research, IASMFBN), 1/1500	
ZO-1 (Invitrogen, 61-7300), 1/100	
CD4 (BD Pharmingen, 558107), 1/70	Âne anti-rat-A488 (Invitrogen, A21208) 1/400
VCAM-1 (eBioscience, 14-1061-82), 1/100	
F4/80 (Biolegend, 123124), 1/100	
JAM-A (SantaCruz, SC-59845), 1/50	
GFAP-Cy3 (Sigma, C9205), 1/1500	- (pas d'anticorps secondaire)

**Tableau S2 : Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux**

<b>Anticorps marquant les populations cellulaires-fluorochrome (compagnie, # cat.), concentration utilisée*</b>	<b>Anticorps marquant les molécules quantifiées-fluorochrome (compagnie, # cat.), concentration utilisée*</b>
CD45-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, 550994), 1 $\mu$ L	MCAM-PE (BioLegend, 134704), 2 $\mu$ L
CD3-FITC (BD Pharmingen, 553062), 2 $\mu$ L	ALCAM-PE (R&D Systems, FAB1172P), 5 $\mu$ L
CD3-APC (BD Pharmingen, 553066), 2 $\mu$ L	VLA-4 (CD49d)-FITC (eBioscience, 11-0492-82), 2 $\mu$ L
CD4-Pe-Cy7 (BD Pharmingen, 552775), 0,5 $\mu$ L	IL-17-PE (BD Pharmingen, 559502), 2 $\mu$ L
CD8-PB (BD Pharmingen, 558106), 4 $\mu$ L	IFN $\gamma$ -APC (BD Pharmingen, 554413), 2 $\mu$ L
CD11b-A700 (BD Pharmingen, 557960), 2 $\mu$ L	CD25-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, 551071), 1 $\mu$ L
CD11c-APC (BD Pharmingen, 550261), 2 $\mu$ L	FoxP3-PE (eBioscience, 12-5773-82), 2 $\mu$ L

\* nombre de  $\mu$ L utilisés lors de l'incubation dans un volume de 50  $\mu$ L de tampon de cytométrie.

