



**Rôle des lymphocytes T_H17 dans la fragilisation de la
barrière héméo-encéphalique et la formation des lésions
de sclérose en plaques**

Hania Kebir

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Microbiologie et Immunologie

Août 2018

© Hania Kebir, 2018

RESUME

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est formée des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales reliées entre elles par des jonctions serrées. Grâce à sa perméabilité restreinte et sélective, la BHE entrave le passage des molécules et cellules du sang vers le système nerveux central (SNC). Chez les patients atteints de sclérose en plaques (SEP), une maladie inflammatoire du SNC, la rupture de la BHE permet aux cellules immunes actives d'infiltrer le tissu cérébral. Il s'ensuit une réaction inflammatoire excessive au cours de laquelle d'autres leucocytes sont recrutés dans le cerveau et qui culmine par la formation des plaques de démyélinisation caractéristiques de la SEP. On dénote au niveau de ces lésions une présence importante de lymphocytes T CD4⁺ activés et de cytokines pro-inflammatoires propres à une réponse de type T_H1, tels l'IFN- γ et l'IL-1. Curieusement cependant, l'inhibition de la voie T_H1 n'empêche pas l'apparition de la maladie dans le modèle murin de la SEP et en aggrave même les symptômes. On attribue maintenant aux lymphocytes T_H17, nommées en raison de leur capacité à produire de l'IL-17, un rôle clé dans le développement de la maladie. L'objectif de ce travail de thèse visait à caractériser les lymphocytes T_H17 chez l'humain et définir leur contribution exacte dans la fragilisation de la BHE, une étape décisive dans la formation des lésions de SEP. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode expérimentale permettant l'expansion *in vitro* de populations de lymphocytes T_H17 à partir de cellules mononucléées du sang de donneurs sains. Nos travaux démontrent que l'IL-23 induit la production d'IL-17, d'IL-22 et de granzyme B par les lymphocytes T CD4⁺CD45RO⁺ mémoires humains et qu'une proportion des cellules exprime de manière concomitante de l'IL-17 et de l'IFN- γ . La fréquence des lymphocytes T CD4⁺ IL17⁺, IL-22⁺ et des doubles positifs IL-17⁺IFN- γ ⁺ est significativement plus élevée dans les lignées de lymphocytes T_H17 provenant de patientes en poussée que dans celles de contrôles. Nos analyses démontrent que les cellules endothéliales de la BHE expriment de faibles niveaux des récepteurs de l'IL-17 et de l'IL-22 à l'état basal mais que leur présence est accrue dans le cerveau de patients atteints de SEP. L'activation du récepteur de l'IL-17 entraîne une augmentation de la

perméabilité de la BHE et une perturbation de l'organisation des protéines de jonction occludine et ZO-1. Finalement, nous démontrons que la migration des lymphocytes T_H17 à travers la BHE est régie en grande partie par la molécule d'adhérence ICAM-1 et que les lymphocytes qui co-expriment l'IL-17 et l'IFN- γ sont plus aptes à franchir la BHE que ceux qui produisent uniquement l'une ou l'autre de ces cytokines. Nous retrouvons d'ailleurs des cellules qui expriment simultanément les facteurs de transcription T-bet et RORC, associés respectivement aux lymphocytes T_H1 et aux T_H17, au sein des infiltrats péri-vasculaires des lésions actives de SEP. Les travaux présentés dans cette thèse auront permis d'affiner nos connaissances sur les mécanismes d'entrée des lymphocytes T_H17 dans le SNC et les propriétés délétères des cytokines qu'ils sécrètent, notamment dans l'activation et la déstabilisation de l'endothélium cérébral.

Mots-clés : barrière hémato-encéphalique (BHE), interféron gamma (IFN- γ), interleukine-17 (IL-17), IL-22, lymphocytes T_H17, migration leucocytaire, sclérose en plaques (SEP).

ABSTRACT

The blood-brain barrier (BBB) plays a crucial role in protecting the central nervous system (CNS) by restricting entry of cells and molecules into the brain. In the CNS disorder multiple sclerosis (MS), breakdown of the BBB allows activated leukocytes to infiltrate the brain parenchyma, leading to the formation of the characteristic demyelinated lesions. For decades, MS was viewed as a T_H1-mediated disease, a notion that was largely supported by studies in its animal model and by the abundance of prototypical T_H1-associated cytokines within active MS lesions. However, over the years, accumulating evidence has highlighted the involvement of another subset of CD4⁺ T cells that express IL-17, therefore named T_H17 lymphocytes, in the pathology of the disease. The goal of the work presented herein was to characterize the human T_H17 lymphocyte population and define their contribution to the disruption of the BBB and leukocyte infiltration into the CNS, both important early events in the formation of MS lesions. To do so, we developed and optimized a method to successfully generate human T_H17 lines *in vitro* from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors. We demonstrate that in response to IL-23, human memory CD4⁺CD45RO⁺ but not naïve CD4⁺CD45RA⁺ T lymphocytes produce IL-17, IL-22, and granzyme B, with a subset of cells simultaneously expressing IL-17 and IFN- γ . Interestingly, we measure a significant increase in the percentage of T CD4⁺ IL17⁺, of IL-22⁺, and of IL-17⁺IFN- γ ⁺ dual producers in T_H17 cell lines expanded from the peripheral blood of acutely relapsing MS women as compared to those generated from healthy controls and remitting MS patients. We show that both IL-17 and IL-22 receptors are upregulated on BBB endothelial cells *in situ* during inflammation and that IL-17 enhances BBB permeability by disrupting the integrity of tight junction proteins occludin and ZO-1. Finally, we provide evidence that T_H17 lymphocytes transmigrate efficiently across human brain endothelial cells via the adhesion molecule ICAM-1 and show that IL-17⁺IFN- γ ⁺ double producers have an increased propensity to do so. Accordingly, we detect lymphocytes that display immunoreactivity against both the T_H1- and T_H17-associated transcription factors T-bet and RORC within perivascular infiltrates of active MS lesions. The work presented in this thesis

has refined our understanding of the mechanisms that drive T_H17 lymphocyte recruitment into the CNS and shed light on the deleterious effect of T_H17-secreted cytokines, specifically in the activation and breakdown of the BBB.

Keywords: blood-brain barrier (BBB), interferon gamma (IFN- γ), interleukin 17 (IL-17), IL-22, leukocyte transmigration, multiple sclerosis (MS), T_H17 lymphocytes.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES ILLUSTRATIONS	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XIV
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1. La sclérose en plaques : un bref aperçu.....	1
1.1 Classification des différentes formes évolutives de la sclérose en plaques	2
1.2 Étiologie de la sclérose en plaques.....	4
Facteurs environnementaux.....	5
Agents infectieux.....	5
Facteurs génétiques.....	6
1.3 La sclérose en plaques : une maladie auto-immune.....	8
Facteurs génétiques et épidémiologiques en faveur d'une étiologie auto-immune de la sclérose en plaques.....	8
La physiopathologie de la sclérose en plaques suggère aussi une étiologie auto-immune	9
Autres arguments en faveur de l'hypothèse auto-immune de la sclérose en plaques.....	11
Candidats potentiels comme auto-antigène dans la sclérose en plaques	11
1.4 Le modèle animal de la sclérose en plaques, l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale	13
Encéphalomyélite autoimmune expérimentale induite par immunisation active	13
Encéphalomyélite autoimmune expérimentale induite par transfert adoptif de lymphocytes T	14
Modèle spontané d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale chez les souris transgéniques	14
Physiopathologie de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale	15

Forces et faiblesses du modèle de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale.....	16
2. La barrière hémocéphalique.....	19
2.1 Barrières du système nerveux central.....	19
L'organisation de l'unité neurovasculaire	22
L'endothélium des capillaires cérébraux	23
La membrane basale.....	25
Les péricytes	25
Les astrocytes	26
Les cellules microgliales.....	27
2.2 Les complexes de jonctions intercellulaires	28
Les jonctions serrées	29
Les jonctions adhérentes	31
2.3 Modèle <i>in vitro</i> de la barrière hémocéphalique humaine	32
Culture primaire de cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux	32
Mesure de la résistance électrique transendothéliale et de la perméabilité <i>in vitro</i>	33
2.4 Modification des propriétés physiologiques de la barrière hémocéphalique dans la sclérose en plaques	34
3. Migration des cellules immunitaires à travers l'endothélium cérébral	37
3.1 Les étapes de la migration leucocytaire à travers la barrière hémocéphalique.....	38
Le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire	38
L'activation des intégrines leucocytaires	40
L'adhérence ferme des leucocytes avec l'endothélium.....	41
La diapédèse.....	43
3.2 Le natalizumab	46
4. Les lymphocytes T_H1 et T_H17 dans la physiopathologie de la sclérose en plaques.....	48
4.1 Le paradigme T _H 1/T _H 2	48
4.2 Implication des lymphocytes T _H 1 dans la sclérose en plaques.....	50

4.3 Paradoxes associés avec la dichotomie T_H1 – T_H2 dans le modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale	51
4.4 La découverte des lymphocytes T_H17	53
4.5 La différenciation des lymphocytes T_H17	54
Contrôle des mécanismes de différenciation des lymphocytes T_H17 chez la souris	54
La différenciation des lymphocytes T_H17 chez l'homme	56
4.6 Propriétés physiologiques et inflammatoires des lymphocytes T_H17	57
L'IL-17	57
L'IL-22	58
L'IL-26	59
Rôle des lymphocytes T_H17 dans le contrôle des infections bactériennes et fongiques	59
Implication des lymphocytes T_H17 dans les maladies à caractère auto-immun	60
4.7 Contribution relative des lymphocytes T_H17 dans la physiopathologie de la sclérose en plaques et de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale	61
Rôle pro-inflammatoire de l'axe IL-17/IL-23 dans le développement de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale	61
Contribution de l'IL-17 dans la physiopathologie de la sclérose en plaques	62
Contribution des cytokines de la voie T_H17 dans l'induction de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale	63
Contribution des lymphocytes T_H1 et T_H17 dans la physiopathologie de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale	63
4.8 Autres acteurs impliqués dans l'axe IL-17/IL-23	64
Les lymphocytes $T_{\gamma\delta}$	64
Les cellules lymphoïdes innées	65
4.9 Les lymphocytes T_H17 comme cible thérapeutique	66
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	69
ARTICLE I	71
ARTICLE II	92
DISCUSSION	136

5. Contexte de l'étude	136
6. Expansion et caractérisation du profil cytokinique des lymphocytes T_H17 chez l'humain.....	137
6.1 Production concomitante d'IL-17 et d'IFN- γ par les lymphocytes T _H 17 mémoires humains	140
6.2 Plasticité du phénotype T _H 17	142
6.3 Phénotype des lymphocytes T _H 17 des patientes atteintes de sclérose en plaques.....	145
7. Fragilisation de la barrière héméo-encéphalique par les lymphocytes T_H17	147
7.1 Expression des récepteurs de l'IL-17 et de l'IL-22 par l'endothélium vasculaire cérébral	147
7.2 Effet de l'activation des récepteurs de l'IL-17 et l'IL-22 sur l'endothélium cérébral	148
7.3 Rôle de l'IFN- γ dans l'activation de l'endothélium vasculaire cérébral....	151
8. Migration des lymphocytes T_H17 à travers la barrière héméo-encéphalique	151
8.1 Molécules d'adhérence impliquées dans la migration des lymphocytes T _H 17 à travers l'endothélium cérébral	153
8.2 Migration des lymphocytes T _H 17 producteurs d'IFN- γ à travers la barrière héméo-encéphalique.....	154
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	156
BIBLIOGRAPHIE	159

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Les formes évolutives de la SEP.....	2
Figure 2. Mécanismes de la réponse immunitaire impliqués dans la physiopathologie de l'EAE et la SEP et la formation des lésions démyélinisantes.....	17
Figure 3. Les trois grandes interfaces entre le sang et le SNC	20
Figure 4. Les diverses composantes de l'unité neurovasculaire	23
Figure 5. Structure moléculaire des jonctions serrées et adhérentes de la BHE.....	29
Figure 6. Modèle <i>in vitro</i> de la BHE humaine	34
Figure 7. Molécules impliquées dans la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire	38

LISTE DES ABREVIATIONS

Act-1	<i>Actin-related gene 1</i>
Ahr	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
ALCAM	<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
APL	<i>Altered peptide ligand</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BATF	<i>Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAR	<i>Coxsackie- and adenovirus receptor</i>
CD	<i>Cluster domain</i>
CFA	Adjuvant complet de Freund
CLEC16A	<i>C-type lectin domain family 16</i>
CLMP	<i>CAR-like membrane protein</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CS-1	<i>Connecting segment-1</i>
EAE	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
EBV	Virus Epstein-Barr
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
ESAM	<i>Endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
ESGL-1	<i>E-selectin glycoprotein ligand-1</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GATA-3	<i>GATA binding protein-3</i>
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GLUT-1	Transporteur de glucose de type I
GlyCAM-1	<i>Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
HHV-6	Virus herpétique humain
HIES	Syndrome d'hyper IgE

HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILCs	<i>Innate lymphoid cells</i>
IL-22BP	<i>IL-22 binding protein</i>
IP-10	<i>Interferon-γ-inducible protein 10</i>
IRF4	<i>Interferon regulatory factor-4</i>
IRF8	<i>Interferon regulatory factor-8</i>
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
kDa	kiloDalton
LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein-1</i>
LCR	Liquide céphalorachidien
LEMP	Leuco-encéphalopathie multifocale progressive
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPAM-1	<i>Lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
MAG	<i>Myelin associated glycoprotein</i>
MAGUK	<i>Membrane-associated guanylate kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MCAM	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
Ninjurin-1	<i>Nerve injury-induced protein-1</i>
NK	<i>Natural killer</i>

PECAM-1	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PLP	<i>Proteolipid protein</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RAG1	<i>Recombination activating gene 1</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
ROR	<i>Retinoic-acid-receptor-related orphan receptor</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SCI	Syndrome clinique isolé
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SNC	Système nerveux central
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphisms</i>
SEP	Sclérose en plaques
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCR	Récepteur des cellules T
TEER	Résistance électrique transendothéliale
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i> ou lymphocyte T auxiliaire
Tie-2	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFRSF1a	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A</i>
TRAF6	<i>TNF-receptor-associated factor 6</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VE-cadhérine	<i>Vascular endothelial cadherin</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
ZO	<i>Zonula occludens</i>

À mes très chers parents, mes soeurette et frêrôt

REMERCIEMENTS

Je ne serais jamais arrivée au terme de cette aventure sans le concours et l'aide précieuse des personnes qui m'ont entourée durant toutes ces années. C'est à mon tour à présent de vous exprimer toute ma reconnaissance.

Je tiens en premier lieu à remercier très chaleureusement le Dr Alexandre Prat de m'avoir ouvert grandes les portes de son laboratoire et de m'avoir confié un sujet à la fois complexe et passionnant. J'ai particulièrement apprécié l'autonomie dont j'ai disposé en travaillant à ses côtés. C'est grâce à lui si aujourd'hui je peux m'épanouir dans ce domaine de recherche. Je lui suis infiniment reconnaissante pour sa remarquable générosité et l'assure ici de mon profond respect et de ma gratitude.

Mes sincères remerciements vont également aux Drs Réjean Lapointe, Jean-François Gauchat, Luc Vallières et Walid Mourad qui me font l'honneur d'évaluer cette thèse. Merci pour l'intérêt que vous portez à nos travaux, le temps et l'énergie que vous avez consacrés à lire cette thèse et les conseils avisés que vous m'avez prodigués afin de me permettre de l'enrichir.

Je suis par ailleurs extrêmement redevable aux Drs Gary Wild, Guy Delespesse et Élie Haddad pour leur disponibilité, leur écoute attentive et leurs encouragements. Vous avez partagé vos connaissances avec beaucoup de gentillesse et de sagesse et m'avez été d'un grand soutien professionnel mais aussi et surtout humain.

Mes remerciements se tournent aussi vers tous ceux qui de près ou de loin ont participé à ce travail et que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces années. À mes collègues et amis Igal, Jorge, Soufiane, Aurore, Romain, Catherine, Fatma, Camille, Monique, Marc-André, Sandra, Laure et Takahiro : vous avez été l'âme du laboratoire. Vous avez su insuffler un esprit solidaire et créer une ambiance conviviale où j'ai tant aimé évoluer. Merci au Dr Duquette, Dr Antel et à Josée Poirier pour leur implication dans ce travail. Je salue également tous ceux que j'ai rencontrés en fin de parcours et qui m'ont tendu la main au moment où j'en avais le plus besoin : Shamir, Shunya, Shoma, Rébecca, Aurélie et Naïl. Je

souhaite bonne route à tous les membres présents des laboratoires Prat, Arbour et Antel. Je remercie aussi vivement le Dr Prat et le programme de bourses d'études supérieures du Canada « Frederick-Banting et Charles-Best » d'avoir financé mes travaux de doctorat.

Pour terminer, je voudrais exprimer une tendresse et reconnaissance particulières à mes proches. Mille mercis à ma maman, mon papa, mes soeurette et frêrôt, pour votre amour inconditionnel, votre soutien indéfectible tout au long de cette aventure, pour avoir enduré mes angoisses, pour vos innombrables attentions et tous les jolis instants de vie partagés ! Je vous aime de tout mon cœur ! Et à ma petite famille élargie : Jorge Iván, Mélanie, Igal et Liesbeth. Votre immense sollicitude a fait fi des distances pour m'accompagner sans faillir dans mes moments de joies et de doutes. Un merci appuyé pour toutes les discussions scientifiques et autres qui m'ont fait grandir mais surtout merci de votre belle complicité !

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. La sclérose en plaques : un bref aperçu

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique dégénérative touchant le système nerveux central (SNC), c'est-à-dire le cerveau, la moelle épinière ainsi que le nerf optique. La SEP affecte plus de 2,5 millions de personnes dans le monde. Le Canada figure parmi les pays où l'on enregistre le plus haut taux d'incidence de la maladie. Selon le site web de la société canadienne de la SEP, on estime que plus de 100 000 personnes seraient atteintes de la maladie au Canada, ce qui engendre des conséquences socio-économiques importantes au pays (<https://scleroseenplaques.ca/a-propos-de-la-sp/quest-ce-que-la-sp>). Typiquement, la SEP se déclare entre 20 et 40 ans et représente l'affection neurologique chronique la plus répandue chez les jeunes adultes (Compston and Coles, 2008; Sospedra and Martin, 2005). C'est une maladie qui touche particulièrement les femmes mais on ignore encore aujourd'hui les raisons de cette prédominance. De plus, on constate une forte augmentation de l'incidence de la SEP chez les femmes par rapport aux hommes depuis les 50 dernières années, avec un ratio se situant actuellement aux alentours de 1 homme pour 3 femmes atteints de la maladie (Amato et al., 2017; Orton et al., 2006).

Les manifestations cliniques de la SEP sont liées à une démyélinisation des fibres nerveuses du SNC, ce qui cause un ralentissement voire même un arrêt de la conduction et de la transmission de l'influx nerveux. La destruction de la myéline, soit la gaine protectrice enveloppant les cellules nerveuses du SNC, induit éventuellement la formation de lésions inflammatoires disséminées qui prennent l'apparence de plaques et qui peuvent être réparties sans aucune systématisation au sein de toutes les zones myélinisées du SNC, d'où le terme anglais *multiple sclerosis* pour désigner la maladie. La substance blanche (cérébelleuse et médullaire), les ventricules cérébraux et le nerf optique représentent des zones privilégiées d'évolution ou d'apparition de plaques, quoique la substance grise puisse également être atteinte (Calabrese et al., 2015; Lassmann et al., 2007; Lucchinetti et al., 2011). L'expression clinique de la maladie est donc très diversifiée en raison des multiples foyers lésionnels et de leur répartition au sein du SNC. Les

symptômes les plus évocateurs comprennent une paraparésie spastique (faiblesse musculaire entraînant de la difficulté à marcher), des troubles de l'équilibre et de la coordination, une baisse de l'acuité visuelle et s'accompagnent souvent d'une fatigue importante. Notons que l'espérance de vie des personnes atteintes de SEP est en moyenne de 7 ans inférieure à celle de sujets contrôles, une estimation appuyée à la fois par des études canadiennes (Marrie et al., 2015) et norvégiennes (Lunde et al., 2017).

1.1 Classification des différentes formes évolutives de la sclérose en plaques

Bien que l'évolution de la SEP soit insidieuse et imprévisible et sa symptomatologie très variable d'un individu à l'autre, on distingue néanmoins diverses formes évolutives de la maladie (Figure 1) :

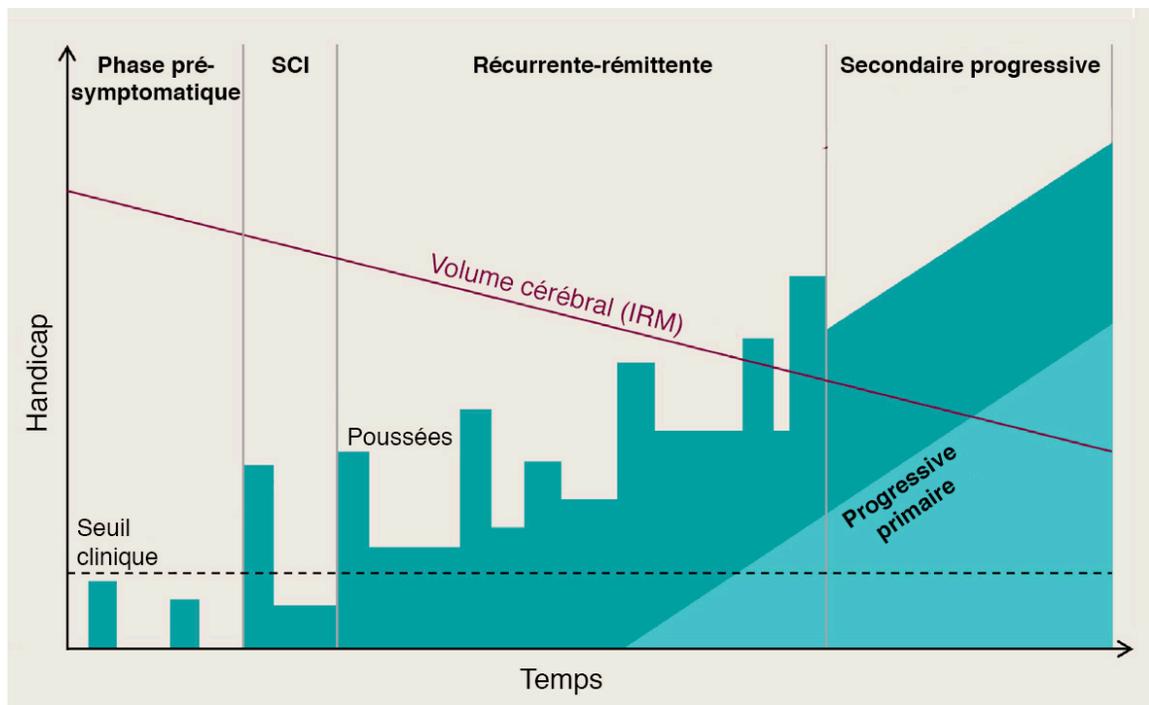


Figure 1. Les formes évolutives de la SEP. Une nouvelle mise à jour de la classification des formes évolutives de la SEP a été introduite en 2013 pour y inclure le syndrome clinique isolé (SCI), soit un évènement inaugural évocateur de SEP. La probabilité est forte pour que le SCI soit le prélude à l'apparition d'une seconde poussée, permettant au clinicien d'établir un diagnostic de SEP. La SEP de type récurrente-rémittente se caractérise par la survenue de poussées bien définies, suivies de périodes de rémission complète ou partielle, sans progression du

handicap entre les poussées. Elle représente la forme la plus fréquente de la maladie (~85% des cas). La SEP secondaire progressive apparaît chez près de 50% des patients après un délai d'évolution de la forme cyclique de 10–15 ans. Le handicap s'aggrave alors de façon continue avec ou sans poussées surajoutées. La SEP progressive primaire touche environ 10% des patients et évolue d'emblée de façon chronique et irréversible avec accentuation progressive des symptômes. Reproduit avec la permission de Elsevier (Baecher-Allan et al., 2018).

Le **syndrome clinique isolé (SCI)** qui correspond à un premier épisode clinique évocateur de SEP, soit une atteinte démyélinisante présumée d'origine inflammatoire qui touche le SNC. Un diagnostic de SCI ne peut être posé que lorsque tout autre diagnostic différentiel a été écarté. Comme son nom l'indique, le SCI peut demeurer un évènement unique ou évoluer vers une SEP cliniquement définie s'il y a démonstration de dissémination des lésions dans l'espace et dans le temps. La mise en évidence de bandes oligoclonales spécifiques dans le liquide céphalorachidien (LCR) chez un patient présentant un SCI typique qui satisfaisait aux critères de dissémination dans l'espace permet de confirmer un diagnostic de SEP et outrepasser la démonstration de dissémination temporelle (Lublin et al., 2014; Thompson et al., 2018).

La SEP de type **récurrente-rémittente**. Cette forme cyclique de SEP se caractérise par des épisodes de poussées alternant avec des phases de rémission complète ou partielle. Une poussée se définit comme l'apparition, la réapparition ou l'exacerbation de signes neurologiques durant plus de 24 heures, et ce en l'absence d'un épisode fébrile (Schumacker et al., 1965). Pour être considérées distinctes, deux poussées doivent être séparées d'un intervalle d'au moins 30 jours. Le rythme des phases de poussées et de rémission est propre à chaque individu mais on ne note généralement pas de progression du handicap entre les poussées dans la forme cyclique. Environ 85% des personnes atteintes de SEP présentent cette forme de la maladie au moment du diagnostic (Lublin and Reingold, 1996). Il s'agit également de la forme qui bénéficie actuellement des traitements les plus efficaces.

La SEP **secondaire progressive**. Elle survient chez près de 50% des patients atteints de la forme récurrente-rémittente, environ 10–15 ans après le déclenchement de la maladie (Vosoughi and Freedman, 2010). Le patient touché par cette forme de SEP connaît dans un premier temps une phase cyclique de la

maladie ponctuée de périodes de rémission, suivie d'une aggravation continue des symptômes neurologiques pendant au moins 6 mois, avec ou sans poussées surajoutées (Lublin and Reingold, 1996).

Dans 10–15% des cas, la SEP évolue d'emblée de manière progressive. On parle alors de SEP **progressive primaire**. Les patients atteints de cette forme de la maladie accumulent des déficits neurologiques permanents dès l'apparition des premiers symptômes, sans que l'on distingue de véritable poussée ni période de rémission (Lublin and Reingold, 1996). Cette forme de SEP présente également quelques particularités cliniques, notamment un âge moyen d'apparition de la maladie plus avancé (autour de 40 ans, comparativement à 30 pour la forme récurrente-rémittente). De plus la SEP progressive primaire touche autant les hommes que les femmes (Miller and Leary, 2007), ce qui contraste avec la prédominance féminine marquée de la forme cyclique de SEP.

Les critères de classification de la SEP ont été revus en 2013 et on recommande dorénavant en plus de définir le phénotype évolutif de la maladie, d'indiquer si son cours est actif ou non (Lublin et al., 2014). L'intérêt d'une telle classification est double : d'une part elle sert à des fins épidémiologiques et d'autre part, elle permet une approche thérapeutique mieux adaptée. En effet, la réponse aux traitements des formes progressives de SEP diffère de celles des formes évolutives avec poussées (Bitsch and Bruck, 2002).

Les travaux décrits dans le second article annexé à cette thèse ont été menés essentiellement sur des patients atteints de la forme cyclique de SEP et n'ayant bénéficié d'aucun traitement durant les 6 derniers mois précédant l'étude. Nos travaux de recherche sur les sujets malades portaient aussi bien sur des patients en poussée que sur des individus en phase de rémission.

1.2 Étiologie de la sclérose en plaques

Depuis la première description clinique de la maladie par le neurologue français Jean-Martin Charcot en 1868 et jusqu'à ce jour, l'étiologie de la SEP demeure en grande partie méconnue. Le développement de la maladie semble toutefois tributaire à la fois de l'influence de facteurs génétiques et environnementaux.

Facteurs environnementaux

On dénote d'importantes disparités géographiques au niveau de la prévalence de la SEP. Les études épidémiologiques mettent en évidence l'existence d'un gradient de répartition de la maladie le long de l'axe Nord-Sud, l'incidence de la maladie étant d'autant plus élevée à mesure que l'on s'éloigne de l'Équateur. Ainsi, certaines zones géographiques connaissent une haute prévalence de SEP, notamment le Canada, les États-Unis, le nord de l'Europe, la Nouvelle-Zélande et l'Australie, tandis que d'autres comme l'Afrique, l'Asie et les pays tropicaux sont peu touchés par la maladie (Kurtzke, 2000).

Cette distribution inégale de la maladie suggère l'intervention d'un facteur exogène. Le climat, une faible exposition au soleil, l'apport insuffisant en vitamine D, le régime alimentaire, l'hygiène, le tabagisme sont autant de facteurs soupçonnés de jouer un rôle dans le développement de la SEP (Giovannoni and Ebers, 2007). Par ailleurs, une corrélation aurait été établie entre le lieu habité pendant les 15 premières années de la vie et le risque de développer la SEP. Les études sur les migrations de population entre pays de prévalence différente indiquent que les jeunes qui émigrent avant l'âge de 15 ans acquièrent le risque du pays d'accueil tandis que les individus qui émigrent après cet âge conservent la prévalence du pays d'origine (Dean and Elian, 1997).

Agents infectieux

L'hypothèse selon laquelle la SEP pourrait être causée par une infection virale a aussi longtemps été considérée. Elle s'appuie sur le fait que plusieurs affections atteignant également la substance blanche du cerveau ont clairement une origine virale, telles la leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP) liée à la présence du virus JC, et l'encéphalopathie subaiguë progressive du virus de l'immunodéficiência humaine (Sospedra and Martin, 2005). Dans le cas de la SEP, la responsabilité de divers virus a été évoquée, notamment ceux de la rougeole, de l'herpès (le virus herpétique humain HHV6) et le virus Epstein-Barr (EBV) responsable de la mononucléose infectieuse (Ascherio and Munger, 2007; Giovannoni et al., 2006). Cependant, la démonstration explicite de leur implication fait encore défaut. La piste qui retient davantage l'attention demeure celle de l'EBV, un pathogène ubiquitaire très répandu dans la population générale. Le risque

ultérieur de développer la SEP serait statistiquement plus élevé chez les personnes ayant contracté une infection à l'EBV. En effet, près de 100% des patients SEP sont séropositifs pour ce virus comparativement à 90% de la population générale (Ascherio and Munger, 2007). L'agent bactérien *Chlamydia pneumoniae* a également été soupçonné, mais comme pour tous les virus cités précédemment, son rôle n'a jamais été démontré (Ascherio and Munger, 2007; Sriram et al., 1999). À ce jour, la piste infectieuse n'a donc toujours pas été étayée. En revanche, il est possible qu'un ou plusieurs pathogènes viraux ou bactériens favorisent la survenue de poussées de SEP ou constituent des cofacteurs potentiels sans pour autant jouer un rôle étiologique direct.

Deux mécanismes principaux ont été proposés afin d'expliquer la façon dont les agents infectieux pourraient déclencher la SEP. Le premier mécanisme fait intervenir le concept de **mimétisme moléculaire** et implique que certains agents infectieux expriment des séquences peptidiques suffisamment homologues avec un antigène du soi pour que la réponse immunitaire normalement dirigée vers l'organisme pathogène induise également une réaction croisée qui cible l'auto-antigène (Sospedra and Martin, 2005; Wucherpfennig and Strominger, 1995). Le second mécanisme évoqué est appelé **effet bystander** et suggère que les produits de l'inflammation libérés en réponse à l'agent infectieux créent un microenvironnement qui favorise l'activation des cellules auto-réactives dans le SNC (Sospedra and Martin, 2005).

Facteurs génétiques

Plusieurs arguments plaident en faveur d'une composante génétique dans l'étiologie de la SEP. L'agrégation familiale des cas de SEP et la fréquence 15–35 fois plus élevée de SEP dans les fratries suggère la présence d'un terrain génétique prédisposant de la maladie (Dyment et al., 2004). Les études épidémiologiques révèlent aussi d'importantes variations dans l'incidence de la SEP selon les groupes ethniques, et ce indépendamment de leur localisation géographique (Rosati, 2001). De plus, le taux de concordance de la SEP chez les jumeaux monozygotes avoisine les 30% alors que celui des jumeaux dizygotes est de seulement 5% (Dyment et al., 2004; Sadovnick et al., 1993). Ce même argument réfute néanmoins le caractère

purement génétique de la maladie et souligne encore une fois l'importante contribution des facteurs environnementaux dans le développement de la SEP.

De nombreuses études ont été réalisées afin d'identifier plus exactement les facteurs génétiques prédisposant à la SEP, surtout dans un but diagnostique et préventif. Ces recherches se sont toutefois avérées complexes en raison du caractère polygénique de la maladie mais aussi dû à la présence possible d'interactions épistatiques qui se produisent lorsque l'expression phénotypique d'un gène interfère ou masque l'expression d'un autre gène (Ramagopalan and Ebers, 2009). Comme c'est le cas pour d'autres maladies de nature génétique complexe, on a avancé la notion de gènes de susceptibilité de la SEP. Une région systématiquement montrée du doigt dans les analyses de liaison génétique est celle associée au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II située sur le chromosome 6p21. Plus précisément, la présence de l'allèle HLA-DRB1*1501 du système HLA (de l'anglais *human leukocyte antigen*) serait associée à une susceptibilité plus grande à la SEP (Dyment et al., 2004). D'après une étude effectuée sur une large cohorte de patients canadiens atteints de SEP, d'autres allèles du complexe HLA, notamment HLA-DRB1*17, seraient également impliqués dans la susceptibilité génétique de la SEP mais ne confèreraient pas tous le même risque relatif de développer la maladie (Dyment et al., 2005). Cette même étude révèle également le rôle protecteur que jouerait l'allèle HLA-DRB1*14 dans la SEP. La présence de cet allèle abrogerait complètement le risque conféré par l'allèle HLA-DRB1*1501 chez les individus qui hériteraient des deux allèles (Ramagopalan et al., 2007). Cependant, les mécanismes d'action selon lesquels les allèles HLA-DRB1 influenceraient la susceptibilité de la SEP n'ont pas encore été élucidés.

Outre le locus HLA pour lequel une association génétique a clairement été établie, aucun autre gène n'ayant un effet décisif n'a pu être identifié au moyen des études de liaison génétique. Mais les progrès des technologies de génotypage à grande échelle (GWAS de l'anglais *genome wide association studies*) ont permis de détecter des polymorphismes nucléotidiques uniques (SNP pour *single-nucleotide polymorphisms*) ayant un effet individuel modeste mais significatif au niveau de la susceptibilité de la SEP. Parmi ceux-ci figurent les gènes codant pour les récepteurs de la chaîne α de l'interleukine (IL)-7 (Lundmark et al., 2007) et de l'IL-2 ainsi que

les gènes CLEC16A (*C-type lectin domain family 16*) et CD58 (International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2007). Depuis, de nouveaux loci de susceptibilité ont été découverts incluant le CD6 (*cluster domain 6*), le facteur de transcription IRF8 (pour *interferon regulatory factor-8*), le TNFRSF1a (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A*) (De Jager et al., 2009), et TYK2, une protéine à activité tyrosine kinase qui interagit avec le domaine intracellulaire de plusieurs récepteurs aux cytokines (Ban et al., 2009). Une vaste étude internationale d'association pangénomique publiée en 2011 permettra de confirmer le rôle de 23 facteurs de risque héréditaire et d'identifier une trentaine d'autres gènes possiblement impliqués dans la susceptibilité à la SEP et dont la majeure partie joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire, en particulier dans la fonction des cellules T (International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2011). Ceux-ci incluent les gènes codant pour la cytokine IL-12 et son récepteur IL-12RB1, pour le récepteur soluble de l'IL-22 (IL-22BP ou IL-22 *binding protein*), pour le facteur de transcription STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*) et la molécule de costimulation CD86.

1.3 La sclérose en plaques : une maladie auto-immune

Facteurs génétiques et épidémiologiques en faveur d'une étiologie auto-immune de la sclérose en plaques

Si l'étiologie de la SEP demeure incertaine, nombre de ses caractéristiques laissent à penser qu'il s'agit d'une maladie auto-immune dans laquelle le système immunitaire s'attaque à une ou diverses composantes du SNC. En premier lieu, l'association de la SEP avec le locus HLA n'est pas sans rappeler le lien étroit entre la spécificité de certains haplotypes HLA et plusieurs affections auto-immunes. À titre d'exemple, la susceptibilité génétique à la polyarthrite rhumatoïde est liée à l'antigène HLA-DR4 (Fugger and Svejgaard, 2000). De même, le risque de développer le diabète insulino-dépendant est plus élevé chez les sujets porteurs des allèles HLA-DR3 et HLA-DR4 (Onengut-Gumuscu and Concannon, 2002).

Une autre caractéristique que la SEP partage avec plusieurs affections auto-immunes est sa prédominance chez la femme, qui s'avère toutefois moins notoire que celle du lupus érythémateux systémique et de la maladie de Sjögren pour lesquels on rapporte un ratio hommes : femmes de 1 : 9 (Whitacre, 2001), et la

neuromyéélite optique (1 homme : 6,5 femmes atteints de la maladie) (Mealy et al., 2012). À l'instar des maladies auto-immunes, on constate aussi fréquemment chez les patientes atteintes de SEP une diminution des poussées lors de la grossesse et une recrudescence de la maladie dans les 3 mois suivant l'accouchement (Confavreux et al., 1998).

La physiopathologie de la sclérose en plaques suggère aussi une étiologie auto-immune

La physiopathologie de la SEP témoigne elle aussi du rôle incontestable de l'immunité dans le développement et l'évolution de la maladie. L'analyse histologique de coupes de cerveaux prélevés post-mortem sur des patients atteints de SEP révèle la présence d'un nombre important de lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (Th de l'anglais *T helper*) au sein des lésions actives, particulièrement au niveau des infiltrats péri-vasculaires (Lucchinetti et al., 1996). On pense que ces lymphocytes T CD4⁺ proviendraient de la périphérie et seraient activement recrutés au sein du SNC en migrant à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Greenwood et al., 2011; Larochelle et al., 2011; Prat et al., 2002). Les lymphocytes T CD4⁺ seraient d'ailleurs à la base du processus inflammatoire et de la formation des lésions de SEP. Puisque les foyers de démyélinisation se situent principalement au niveau de la substance blanche du SNC, plusieurs chercheurs ont suggéré que la pathologie de la SEP pourrait être attribuée à une augmentation dans le sang périphérique, de la fréquence des lymphocytes T dirigés contre divers constituants de la myéline chez les patients atteints de SEP par rapport aux sujets sains (Olsson et al., 1992; Pender et al., 2000). Cependant, les cellules T spécifiques envers les antigènes de myéline existent aussi à l'état physiologique dans le sang d'individus en santé (Hellings et al., 2001) et ce, en nombres comparables avec ceux des patients atteints de SEP (Jingwu et al., 1992). Les recherches subséquentes ont donc visé à établir si les lymphocytes T auto-réactifs prélevés à partir du sang de patients atteints de SEP se distinguaient qualitativement de ceux de sujets contrôles, notamment quant à leur état d'activation. À cet égard, l'équipe du Dr Hafler a constaté une augmentation de la fréquence des lymphocytes T auto-réactifs exprimant à leur surface le marqueur d'activation CD25 chez des patients atteints de SEP comparativement à des sujets témoins (Zhang et al., 1994). Néanmoins, même si la physiopathologie de la SEP

apparaît comme étant intimement liée à la présence de lymphocytes T CD4⁺, les arguments permettant d'établir qu'il existe des différences explicites au niveau du profil phénotypique des lymphocytes T auto-réactifs chez les patients atteints de la maladie sont nettement insuffisants.

Outre les lymphocytes T, on retrouve au niveau des infiltrats péri-vasculaires de lésions actives de SEP des cellules dendritiques, des macrophages ainsi que quelques lymphocytes B. On y détecte aussi des médiateurs solubles tels des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et parfois même des dépôts du complément et des anticorps (Chabas, 2006; Lucchinetti et al., 1996). À ce propos, l'implication de l'immunité humorale dans la pathologie de la SEP fournit un autre argument indirect en faveur de l'étiologie auto-immune de la maladie. Des auto-anticorps spécifiquement dirigés contre un constituant de la myéline, la glycoprotéine MOG (de l'anglais *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), ont été isolés au sein des lésions de SEP, plus particulièrement dans les zones où le processus de démyélinisation est en cours (Genain et al., 1999; Raine et al., 1999).

L'analyse du profil de migration électrophorétique des protéines du LCR, effectuée en parallèle avec celle du sérum des patients atteints de SEP, contribue également à confirmer la présence d'une inflammation intrathécale. Elle permet la mise en évidence d'un profil de bandes oligoclonales qui sont définies comme un groupe d'immunoglobulines (IgG) d'hétérogénéité restreinte. La présence de ces bandes oligoclonales dans le LCR, combinée à leur absence du profil sérique correspondant, démontre de manière indirecte l'activation de clones de lymphocytes B dans le SNC. Même si on ignore encore le rôle et la spécificité antigénique des Ig produites en SEP, elles interviennent certainement dans l'évolution de la maladie. La présence de bandes oligoclonales de type IgG contribue à valider le diagnostic de SEP, puisque on les décèle chez plus de 90% des sujets atteints de la maladie (Cross et al., 2001). Il convient cependant de mentionner qu'un profil de bandes oligoclonales positif peut également être observé dans d'autres maladies neurologiques inflammatoires comme la neurosyphilis et la neurosarcoïdose (Fadil et al., 2007).

Autres arguments en faveur de l'hypothèse auto-immune de la sclérose en plaques

L'hypothèse de la maladie auto-immune est renforcée par l'observation de l'effet bénéfique des traitements à visée anti-inflammatoire tels les immunosuppresseurs (comme l'azathioprine et la mitoxantrone) et les agents aux propriétés immunomodulatrices (par exemple l'interféron (IFN)- β et l'acétate de glatiramère). Au contraire, les molécules comme l'IFN- γ qui activent le système immunitaire ont un effet délétère dans la SEP (Panitch et al., 1987).

Candidats potentiels comme auto-antigène dans la sclérose en plaques

Bien que l'immunité joue incontestablement un rôle capital dans le développement et l'évolution de la SEP, il subsiste encore des doutes quant à l'antigène responsable de l'activation de la réponse immunitaire dans la SEP (Chabas, 2006). L'identification de la cible du processus inflammatoire demeure d'ailleurs aujourd'hui un des enjeux majeurs de la recherche en SEP et permettrait sans aucun doute de développer des traitements plus adaptés. Puisque les lésions de SEP prédominent dans la substance blanche, la recherche de l'auto-antigène en cause s'est traditionnellement concentrée sur les protéines de la myéline. Tel que mentionné plus haut, des auto-anticorps dirigés contre les peptides de myéline ont été identifiés au sein des lésions de SEP, mais la cible majeure des Ig des bandes oligoclonales demeure inconnue (Genain et al., 1999; Raine et al., 1999). Des lymphocytes T exprimant un récepteur de cellules T (TCR, de l'anglais *T cell receptor*) qui reconnaît les protéines MBP (*myelin basic protein*), MAG (*myelin associated glycoprotein*), MOG ou PLP (*proteolipid protein*) ont également été décelés dans le sang périphérique de patients atteints de SEP (Hellings et al., 2001). Leur fréquence n'étant pas différente de celle retrouvée chez les sujets sains, cette caractéristique n'est donc pas exclusive aux patients. En clair, des lymphocytes T auto-réactifs capables de reconnaître les mêmes épitopes de myéline sont retrouvés dans le sang périphérique des individus en santé comme dans celui des patients atteints de SEP (Comabella and Khoury, 2012). Malgré l'absence de différence entre la réponse anti-myéline des lymphocytes T en SEP par rapport aux contrôles sains, il existe une preuve indéniable et éloquente de l'implication des antigènes de myéline dans la SEP. Celle-ci provient d'un essai clinique tentant de dévier la réponse des cellules T spécifiques contre la myéline vers un profil moins inflammatoire par l'injection aux

patients d'un peptide de la MBP légèrement modifié (APL pour *altered peptide ligand*). Les résultats n'ont toutefois pas été ceux escomptés et ont plutôt conduit à une amplification de la réponse des lymphocytes T vis-à-vis l'antigène MBP et ont induit une exacerbation de la maladie tant clinique que radiologique chez les patients traités (Bielekova et al., 2000).

L'anatomopathologie de la SEP révèle que les dommages ne se limitent pas uniquement à la gaine de myéline mais visent également parfois les axones et les oligodendrocytes, c'est-à-dire les cellules qui assurent la formation de la myéline (Lucchinetti et al., 2001). Il est donc envisageable qu'un antigène autre qu'une protéine de la myéline, ou même que plusieurs antigènes puissent être impliqués dans la pathologie de la SEP. En 2007, l'équipe du Dr Steinman de l'Université de Stanford a d'ailleurs identifié l' α B-crystalline comme un auto-antigène susceptible d'intervenir dans la formation des lésions de SEP et a détecté des auto-anticorps dirigés contre cette protéine en quantités importantes dans le LCR de patients atteints de SEP (Ousman et al., 2007). Par ailleurs, le caractère très hétérogène de la pathologie de la SEP, que ce soit entre patients ou au sein des différentes lésions chez un même individu, rend l'identification des cibles antigéniques encore plus difficile. Il est concevable que l'auto-antigène responsable de l'activation du système immunitaire dans la SEP puisse être différent d'un patient à l'autre. Il se pourrait également qu'au cours de l'évolution de la maladie chez un individu donné, la réponse antigénique se diversifie en raison de l'apparition de nouveaux épitopes antigéniques. Ces nouveaux épitopes pourraient soit provenir de la même protéine que l'antigène qui a initié la réponse immunitaire ou provenir d'une protéine différente. Ce phénomène appelé essaimage antigénique (*epitope spreading*) a été décrit dans des modèles animaux expérimentaux de la SEP mais sa démonstration chez l'humain reste à faire (McMahon et al., 2005). Pour toutes les raisons susmentionnées, aucune étude n'a été en mesure de trancher formellement en faveur d'un antigène particulier responsable de la maladie (Chabas, 2006). Cependant, plusieurs peptides de myéline sont capables d'induire dans de nombreuses espèces animales, une réaction inflammatoire au niveau du SNC qui reproduit relativement fidèlement certains aspects de la maladie humaine. C'est le modèle de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE).

1.4 Le modèle animal de la sclérose en plaques, l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

Un des défis majeurs en ce qui concerne les études d'anatomopathologie de la SEP est l'accès limité aux biopsies cérébrales, qui sont d'ailleurs presque exclusivement prélevées en post-mortem. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent la pathologie de la SEP repose donc en grande partie sur les observations faites à partir de modèles animaux expérimentaux, l'EAE étant sans contredit le plus couramment utilisé. L'EAE représente un bon modèle pour la SEP puisqu'il simule sur plusieurs points la maladie humaine. De fait, ce modèle expérimental a largement contribué à enrichir les connaissances sur la pathologie de la SEP, a conduit à l'implémentation de plusieurs stratégies thérapeutiques chez l'humain (Copaxone™, natalizumab) et est même à l'origine de nouveaux concepts fondamentaux en immunologie (Cua et al., 2003; Wekerle, 2008). L'EAE est une pathologie auto-immune démyélinisante du SNC qui peut être induite chez de nombreuses espèces animales (primates non-humains, marmousets, rats et plus communément la souris) en suivant divers protocoles expérimentaux tels ceux décrits ci-dessous.

Encéphalomyélite autoimmune expérimentale induite par immunisation active

L'EAE peut être induite par immunisation active dans certaines lignées de souris susceptibles, en leur injectant par voie sous-cutanée un des peptides immunogènes dérivés de la myéline en émulsion avec l'adjuvant complet de Freund (CFA) (Stromnes and Goverman, 2006a). L'immunisation s'accompagne d'une ou deux injections répétées de toxine pertussique. Celle-ci faciliterait l'induction de la maladie en augmentant la perméabilité de la BHE (Linthicum et al., 1982), quoique certains soutiennent qu'elle exerce plutôt des effets pléiotropiques sur le système immunitaire en stimulant la production de cytokines (Ronchi et al., 2016) et en favorisant la réponse d'hypersensibilité retardée (Hofstetter et al., 2002; Sewell et al., 1983). Le mode d'évolution de la maladie varie grandement en fonction du type d'auto-antigène injecté et de la souche de souris immunisées. Ainsi, les souris de la souche C57BL/6 injectées avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ développent une forme aiguë et monophasique d'EAE analogue à la SEP progressive, tandis que les souris SJL/J

injectées avec le peptide MOG_{92–106}, PLP_{139–151}, PLP_{178–191} ou MBP_{89–101} développent une EAE avec poussées s'apparentant davantage à la forme cyclique de SEP avec rechutes (Miller and Karpus, 2007).

Les premiers symptômes apparaissent typiquement 10–15 jours après l'immunisation et sont souvent précédés d'une perte de poids importante. Les animaux développent ensuite une paralysie progressive qui débute par une perte de tonicité au niveau de la queue (score clinique de 1), une parésie (score 2) puis une paralysie des membres postérieurs (score 3) qui atteint finalement les membres antérieurs (score 4). Lorsque l'animal apparaît moribond, on lui attribue un score clinique maximal de 5 (Stromnes and Goverman, 2006a).

Encéphalomyélite autoimmune expérimentale induite par transfert adoptif de lymphocytes T

L'EAE peut également être induite par transfert passif de lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs à des animaux syngéniques (Ben-Nun et al., 1981; Stromnes and Goverman, 2006b). Cette méthode d'induction de la maladie a permis de mettre en lumière le rôle prépondérant des lymphocytes T CD4⁺ dans la pathologie de l'EAE, et par conséquent de la SEP. Les lymphocytes T CD4⁺ activés sont prélevés à partir d'un animal chez lequel l'EAE a été induite par immunisation active et produisent majoritairement des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , le TNF (pour *tumor necrosis factor*) (propres à une réponse de type T_H1) et l'IL-17 (qui caractérise la réponse de type T_H17) (Fletcher et al., 2010; Wekerle, 2008). Quelques jours suivant le transfert, l'animal receveur développe une maladie dont la symptomatologie est très semblable à celle de l'EAE provoquée par immunisation active (Miller and Karpus, 2007). Les études d'EAE par transfert s'effectuent presque exclusivement à l'aide de lymphocytes T CD4⁺ puisque peu de chercheurs ont été en mesure de démontrer le potentiel pathogène des lymphocytes T CD8⁺ dans le modèle de transfert adoptif (Weiss et al., 2007).

Modèle spontané d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale chez les souris transgéniques

Jusqu'à tout récemment, il n'existait à priori aucun modèle animal expérimental capable de développer spontanément une encéphalomyélite analogue à la SEP. Par

contre, certaines lignées de souris transgéniques qui expriment un récepteur de cellules T (TCR, de l'anglais *T cell receptor*) spécifique envers un peptide de myéline à la surface d'une large proportion de leurs lymphocytes T développent une forme d'EAE spontanée. L'équipe du Dr Wekerle a précisément généré une lignée de souris transgéniques issues de la souche SJL/J dont les lymphocytes T expriment un TCR spécifique au peptide MOG₉₂₋₁₀₆. Ces souris développent spontanément une EAE qui évolue par poussées successives entrecoupées de rémissions, semblable à la forme cyclique de la SEP (Pollinger et al., 2009).

Physiopathologie de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

Le modèle de l'EAE, qu'il soit spontané, induit par immunisation active ou par transfert adoptif, est à l'origine de progrès considérables sur notre compréhension de la physiopathologie de la SEP. Les mécanismes de la réponse immunitaire dans l'EAE (illustrés à la Figure 2) font intervenir au premier plan les lymphocytes T CD4⁺. Ceux-ci reconnaissent, via leur récepteur TCR, les antigènes de myéline présentés par une molécule du CMH de classe II exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Lorsque les lymphocytes T auto-réactifs sont activés au niveau des ganglions lymphatiques drainant le site d'injection, ils augmentent à leur surface l'expression des molécules d'adhérence, leur conférant ainsi la capacité de migrer à travers la BHE pour accéder au SNC. À l'opposé, les lymphocytes T non-activés sont incapables de franchir la BHE (Flugel et al., 2001). Une fois dans l'espace péri-vasculaire, les lymphocytes T sont réactivés de nouveau en entrant une fois de plus en contact avec une cellule présentatrice d'antigène (Greter et al., 2005). Les lymphocytes T activés encéphalitogènes se mettent alors à produire localement une panoplie de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17, l'IFN- γ , l'IL-6, le TNF et des chimiokines qui attirent les granulocytes et macrophages au SNC (Korn et al., 2010). Eux-mêmes contribuent à l'inflammation locale et participent au processus de démyélinisation (Dijkstra et al., 1992). La démyélinisation s'accompagne d'une libération de radicaux libres et une augmentation de l'expression d'oxyde nitrique. Souvent, et en fonction du mode d'évolution de l'EAE, la réaction inflammatoire s'atténue d'elle-même malgré l'absence de toute intervention thérapeutique (Korn et al., 2010).

Forces et faiblesses du modèle de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

L'EAE est couramment utilisée aujourd'hui en tant que modèle d'étude de la SEP car les deux maladies partagent plusieurs caractéristiques cliniques et histopathologiques. La susceptibilité de l'EAE, tout comme la SEP, est aussi influencée par des facteurs génétiques associés au CMH de classe II (Goverman, 2009). Néanmoins, il existe des différences majeures entre la SEP et l'EAE. Plusieurs approches à visée thérapeutique bénéfiques en EAE se sont soldées par des échecs probants chez l'humain. Citons à titre d'exemple l'anti-TNF- α qui, malgré ses effets protecteurs sur le développement de l'EAE, exacerbe la maladie lorsqu'administré à des patients atteints de SEP (Steinman and Zamvil, 2005).

Une des différences prééminentes entre les deux maladies réside dans le fait que l'EAE n'est pas spontanée. De plus, le peptide immunisant est unique dans l'EAE alors qu'aucun antigène n'a pu faire preuve absolue de son rôle immunogène dans la SEP. Par ailleurs, la majorité de l'infiltration leucocytaire se situe au niveau de la moelle épinière, et dans une moindre mesure dans le cervelet des souris atteintes d'EAE, tandis que les cellules infiltrant le SNC se retrouvent principalement dans le parenchyme cérébral lors de la SEP (Baker et al., 2011). Finalement, la maladie se présente sous une forme dite monophasique chronique sans rémission dans les souris utilisées le plus fréquemment, soit celles de la souche C57BL/6, ce qui ne correspond pas à la forme prédominante cyclique de la SEP (Handel et al., 2011).

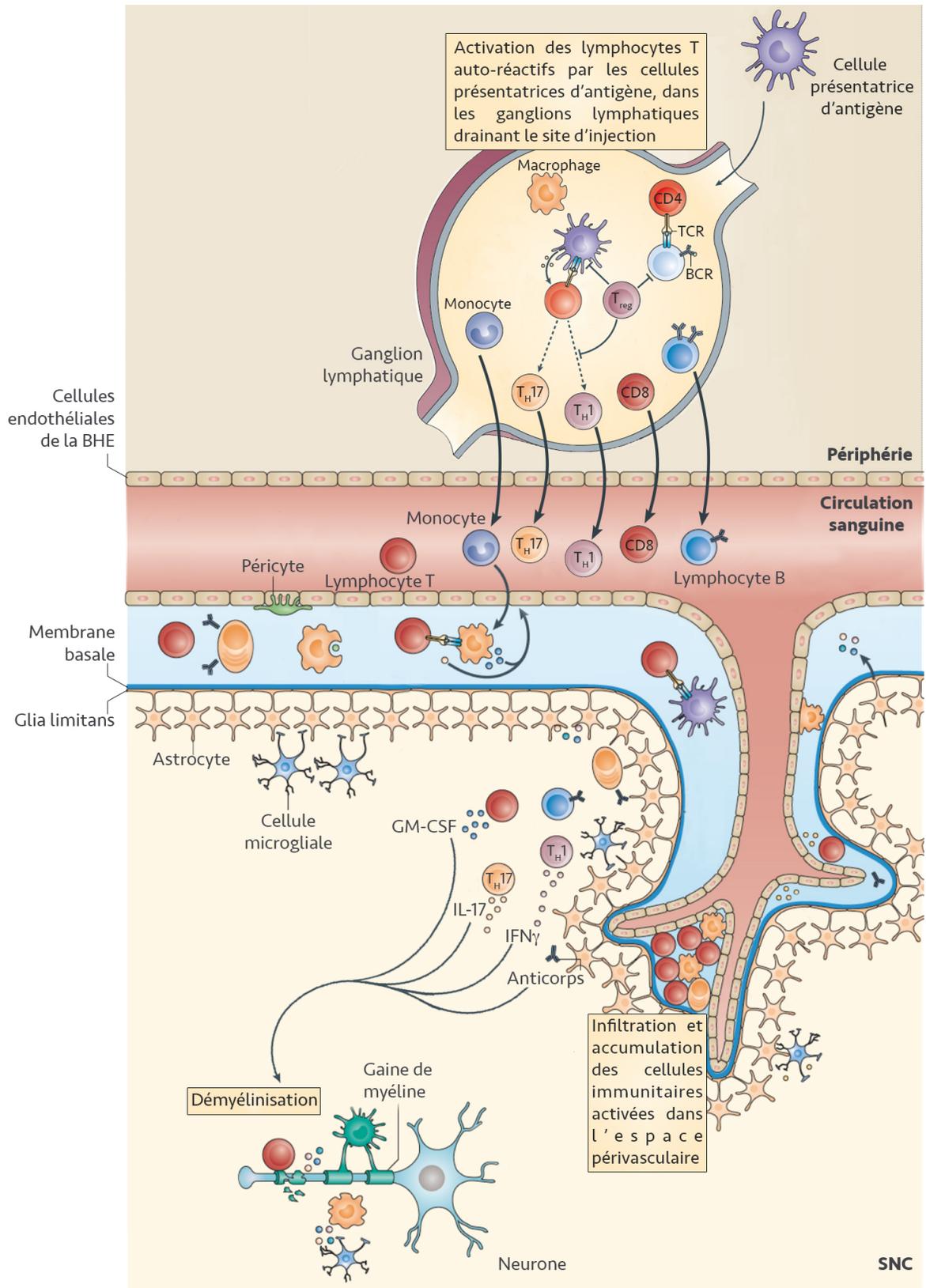


Figure 2. Mécanismes de la réponse immunitaire impliqués dans la physiopathologie de l'EAE et la SEP et la formation des lésions démyélinisantes. Les lymphocytes auto-réactifs dirigés contre des antigènes de la

myéline sont activés dans les ganglions lymphatiques cervicaux. Cette activation peut survenir suite à l'exposition à un agent infectieux qui partagerait des déterminants antigéniques communs avec un antigène du soi, par un phénomène appelé mimétisme moléculaire. Il peut également s'agir de l'activation de lymphocytes T auto-réactifs naturels qui auraient échappé à la sélection thymique. Une fois activés, les lymphocytes augmentent l'expression de molécules d'adhérence à leur surface membranaire, permettant ainsi leur passage à travers la BHE. Les lymphocytes T CD4⁺ différenciés (en T_H1 et en T_H17), les lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes B et les cellules immunitaires innées pénètrent alors dans le SNC où ils initient un phénomène inflammatoire local. Les lymphocytes T sont de nouveau réactivés par les cellules présentatrices d'antigène au niveau de l'espace péri-vasculaire. Cette interaction induit une prolifération clonale des lymphocytes T et provoque la libération de facteurs cytotoxiques, notamment des cytokines et chimiokines, qui augmentent la perméabilité de la BHE, facilitent le recrutement d'autres cellules inflammatoires dans le SNC et contribuent au processus de démyélinisation. Reproduit avec la permission de Nature Publishing Group (Dendrou et al., 2015).

Les modèles murins transgéniques dans lesquels l'EAE se développe de manière spontanée simulent mieux certains aspects de la SEP, mais le fait que ces souris résultent de croisements consanguins et de manipulations génétiques multiples représente toutefois un inconvénient non négligeable (Handel et al., 2011).

Somme toute, il existe aujourd'hui plusieurs modèles d'EAE, chacun simulant quelques aspects de la maladie mais aucun n'en présentant toutes les caractéristiques. Il est donc important de choisir un modèle d'EAE adapté pour chaque étude spécifique en réalisant toutefois que l'EAE demeure avant tout un modèle. Nous avons nous-mêmes fait appel à différents modèles murins d'EAE, induits principalement dans la souche de souris C57BL/6, afin de compléter nos études *in vitro* et *in situ* sur la SEP.

2. La barrière hémato-encéphalique

Dans le chapitre précédent, il a été question de l'implication indéniable du système immunitaire dans l'évolution et la physiopathologie de la SEP. Plusieurs acteurs principaux interviennent manifestement dans le processus inflammatoire qui aboutit à la formation des lésions de SEP : particulièrement les lymphocytes T CD4⁺, les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B ainsi que les facteurs solubles qu'ils sécrètent. Cet aspect de la maladie a d'ailleurs été mis à profit dans l'élaboration de diverses stratégies thérapeutiques qui ciblent de manière spécifique le système immunitaire. Il n'en demeure pas moins que ni l'immunosuppression ni l'ablation totale du système immunitaire, suivi de sa reconstitution au moyen de cellules souches, ne se sont avérées être des traitements curatifs sûrs à long terme (Bar-Or, 2008; Burt et al., 2003). Ceci reflète vraisemblablement la participation importante du SNC et de la réaction inflammatoire locale qui y prend place dans le développement et l'évolution de la maladie. Cela illustre également à quel point l'environnement cloisonné que constitue le SNC limite l'efficacité des médicaments administrés en périphérie pour le traitement de la SEP. Les interactions entre le système immunitaire et le SNC sont donc inhérentes à la pathologie de la SEP. Nous aborderons, dans le présent chapitre, l'organisation des différentes composantes du SNC qui forment l'unité neurovasculaire, soit les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, la matrice extracellulaire, les astrocytes, les péricytes, les cellules microgliales et les neurones (Abbott et al., 2006; Hawkins and Davis, 2005). Nous prêterons une attention particulière aux caractéristiques structurales et fonctionnelles des cellules endothéliales de la BHE. Il sera également question du rôle actif de la BHE dans la pathologie de la SEP.

2.1 Barrières du système nerveux central

Il existe sur le plan anatomique trois grandes interfaces entre le sang et le SNC, soit la BHE localisée au niveau de l'endothélium des microvaisseaux cérébraux, la barrière sang-LCR constituée principalement des cellules épithéliales épendymaires des plexus choroïdes et la barrière hémato-méningée (Figure 3) (Engelhardt and Sorokin, 2009). Ces trois barrières contrôlent l'apport des nutriments et de l'oxygène au SNC et régulent de manière stricte les échanges

moléculaires et cellulaires entre le flux sanguin et le SNC. Leur intégrité est donc essentielle au maintien de l'homéostasie du SNC.

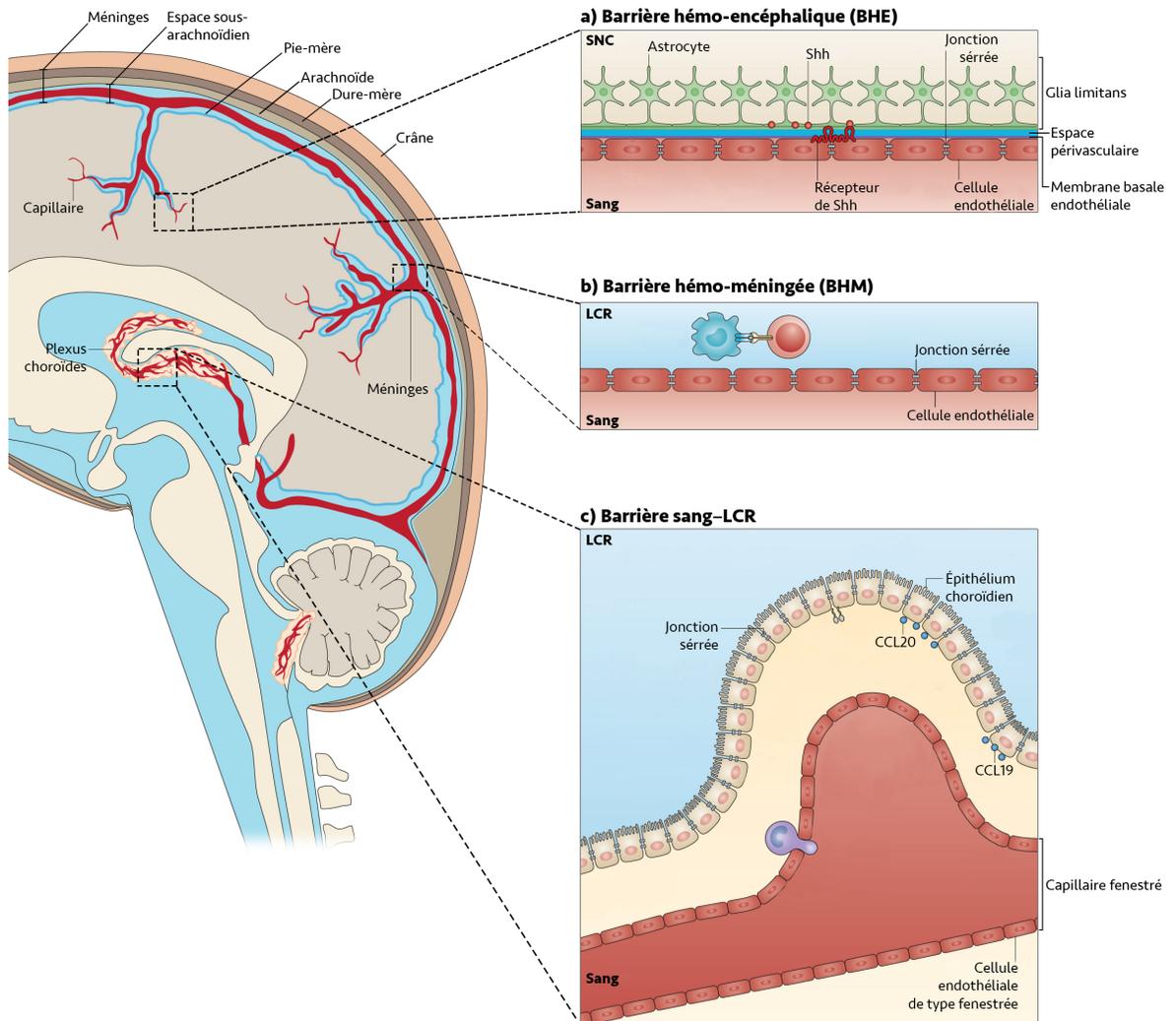


Figure 3. Les trois grandes interfaces entre le sang et le SNC. Sur le plan anatomique, on distingue trois grandes interfaces entre le sang et le SNC : **a)** la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui régule les échanges entre le sang et le parenchyme. Elle est formée de cellules endothéliales, de péricytes, de la lame basale et de la *glia limitans*. Les cellules endothéliales de la BHE sont reliées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes. Les pieds astrocytaires qui forment la *glia limitans* recouvrent plus de 99% de la surface des capillaires du SNC ; **b)** la barrière hémato-méningée est formée d'un endothélium lui aussi pourvu de jonctions serrées et contenu dans l'espace sous-arachnoïdien des méninges. Les méninges sont les membranes qui enveloppent le cerveau et la moelle épinière. Elles se répartissent en trois couches : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. La dure-mère est l'enveloppe méningée la plus externe et est accolée au tissu osseux. L'arachnoïde est la tunique méningée centrale. La pie-mère, qui est la couche la plus interne, est richement vascularisée et adhère au parenchyme nerveux.

L'arachnoïde et la pie-mère constituent les leptoméniges et délimitent l'espace sous-arachnoïdien dans lequel circule le liquide céphalo-rachidien (LCR) ; **c**) la barrière sang-LCR se situe au niveau des plexus choroïdes qui font saillie dans la lumière des ventricules cérébraux. Plus particulièrement, c'est l'épithélium en continuité avec l'épendyme des plexus choroïdes qui exprime des jonctions serrées et contrôle les échanges entre le sang et le LCR. Les cellules endothéliales qui bordent les capillaires des plexus choroïdes sont de type fenestré. Reproduit avec la permission de Nature Publishing Group (Shechter et al., 2013).

La barrière sang-LCR se retrouve au niveau des plexus choroïdes, ces petites structures hyper-vascularisées qui s'invaginent dans les cavités ventriculaires cérébrales. Les cellules endothéliales qui bordent les capillaires des plexus choroïdes sont de type fenestré et n'exercent donc pas de fonction de barrière. Ce sont les cellules épithéliales, en continuité avec l'épendyme qui tapisse les ventricules cérébraux et dotées de jonctions serrées à leur pôle apical, qui assurent la perméabilité sélective de la barrière sang-LCR (Engelhardt and Sorokin, 2009). L'épithélium choroïdien ne constitue cependant pas une barrière aussi étanche que l'endothélium formant la BHE (Sharma and Johanson, 2007). De plus, la composition des jonctions serrées diffère quelque peu dans les deux barrières (Wolburg et al., 2001), ce qui pourrait contribuer à expliquer les variations dans les mesures de résistance électrique au niveau de ces interfaces. L'épithélium des plexus choroïdes est pourvu de nombreux systèmes de transport actif qui permettent l'afflux d'ions et de nutriments au LCR. Outre leur fonction de barrière, les cellules épithéliales des plexus choroïdes sont également responsables de la sécrétion du LCR (Engelhardt and Sorokin, 2009).

La barrière hémoméningée est contenue dans l'espace sous-arachnoïdien des méninges à l'intérieur duquel baigne le LCR (Engelhardt and Ransohoff, 2012). Les méninges sont les trois feuillets de tissu protecteur qui enveloppent le SNC. La dure-mère est la membrane la plus externe et la plus résistante. Elle tapisse la surface interne des os du crâne. Les deux feuillets souples des méninges constituent les leptoméniges et comprennent l'arachnoïde et la pie-mère. Ce sont elles qui délimitent l'espace sous-arachnoïdien. La pie-mère représente la couche la plus profonde des méninges. Elle est étroitement accolée au SNC et est parcourue de nombreux vaisseaux sanguins. L'arachnoïde est la membrane méningée

intermédiaire, sous-jacente à la dure-mère. Elle émet de délicates travées de tissu conjonctif vers la pie-mère. On sait relativement peu de choses sur les propriétés de l'endothélium qui forme la barrière hémoméningée hormis qu'il est moins étanche que celui de la BHE. Les principales différences entre ces deux barrières seraient liées à une disparité au niveau de la composition moléculaire de leurs jonctions serrées et à l'absence de point de contact direct entre les vaisseaux méningés et les pieds astrocytaires (Allt and Lawrenson, 1997).

La BHE, quant à elle, siège au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux et contrôle les échanges entre le compartiment sanguin et le parenchyme cérébral. La BHE couvre une surface vasculaire 5000 fois plus importante que celle offerte par l'interface sang-LCR (Pardridge et al., 1981) et est donc considérée comme étant la barrière principale entre la circulation sanguine et le SNC. Les sections suivantes viseront à décrire de manière plus détaillée l'organisation particulière de la BHE.

L'organisation de l'unité neurovasculaire

La BHE est reconnue aujourd'hui comme étant une interface dynamique dont les propriétés physiologiques, structurelles et fonctionnelles sont hautement régulées par les interactions paracrines entre les cellules endothéliales vasculaires, les péricytes, les neurones, les cellules gliales (astrocytes, cellules microgliales), la membrane basale et même les effecteurs du système immunitaire (Neuwelt et al., 2011; Stanimirovic and Friedman, 2012). Cette coopération étroite entre l'endothélium microvasculaire de la BHE et les différents acteurs cellulaires et acellulaires mentionnés ci-dessus a mené à l'élaboration d'un nouveau concept qui redéfinit la BHE comme faisant partie d'un véritable complexe fonctionnel appelé « unité neurovasculaire ». La figure 4 illustre les diverses composantes qui font partie intégrante de l'unité neurovasculaire. L'organisation structurelle de ce complexe contribue à l'établissement et au maintien des propriétés de la BHE, contrôle le débit sanguin cérébral, préserve la composition physiologique du microenvironnement au sein du SNC et assure par le fait même le bon fonctionnement des circuits neuronaux et de l'activité gliale (Zlokovic, 2011). Cependant, le dysfonctionnement d'une des composantes intégratives de l'unité neurovasculaire, notamment les modifications au niveau de la perméabilité de la

BHE, intervient dans la physiopathologie de nombreuses affections neurologiques incluant la SEP (Neuwelt et al., 2011).

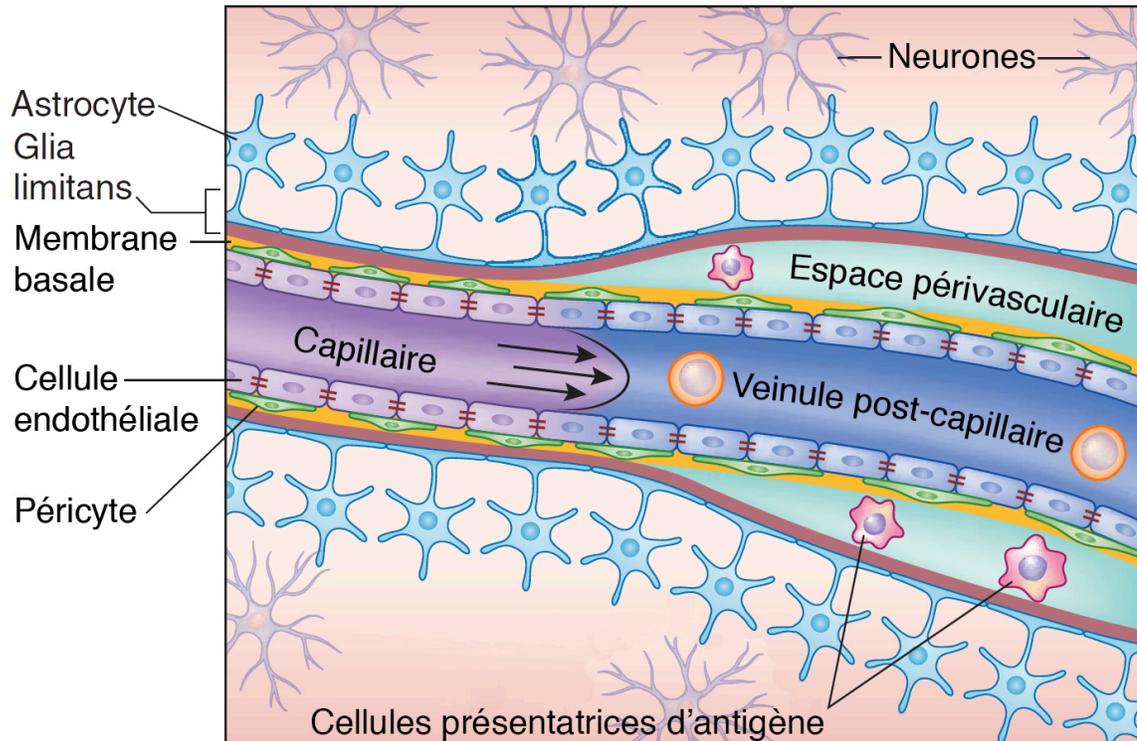


Figure 4. Les diverses composantes de l'unité neurovasculaire. La BHE, localisée au niveau des capillaires du SNC, fait partie intégrante de l'unité neurovasculaire et assure le maintien de l'homéostasie cérébrale. Elle est constituée principalement d'une monocouche de cellules endothéliales étroitement soudées par des jonctions serrées et adhérentes. Cet endothélium repose sur une lame basale dans laquelle sont enchâssés les péricytes. Le ratio péricytes : cellules endothéliales est estimé à 1 pour 3 au niveau du SNC. Les pieds astrocytaires forment un manchon quasi-continu le long de la surface abluminale des capillaires du SNC et jouent un rôle déterminant dans l'induction et le maintien des propriétés de la BHE. Les neurones et les cellules microgliales travaillent de concert avec les autres acteurs de l'unité neurovasculaire afin de réguler de manière sélective les échanges entre le sang et le parenchyme. Reproduit avec la permission de Nature Publishing Group (Engelhardt et al., 2017).

L'endothélium des capillaires cérébraux

L'endothélium des microvaisseaux cérébraux représente le siège anatomique de la BHE. Il est formé d'une monocouche de cellules endothéliales qui reposent sur une membrane basale continue où sont enchâssés des péricytes et sur laquelle s'appuient des pieds astrocytaires (Neuwelt et al., 2011). Les cellules endothéliales

de la BHE possèdent diverses caractéristiques structurelles et métaboliques qui les distinguent de celles de la périphérie. D'une part, elles ne présentent pas de fenestration transendothéliale (Fenstermacher et al., 1988). Elles sont toutefois dotées de jonctions serrées et adhérentes spécifiques qui renforcent les contacts intercellulaires et limitent considérablement la migration paracellulaire des molécules et cellules provenant de la circulation sanguine. Par ailleurs, les cellules endothéliales des capillaires cérébraux sont pauvres en vésicules de pinocytose, ce qui témoigne de la faible activité de transcytose à travers l'endothélium de la BHE (Hawkins and Davis, 2005). Elles comprennent également un nombre élevé de mitochondries par rapport aux cellules endothéliales des capillaires périphériques, afin de combler les besoins énergétiques nécessaires aux processus de transport actif de la BHE. L'abondance de mitochondries rend aussi compte de l'activité métabolique intense des cellules endothéliales de la BHE. La principale caractéristique de l'endothélium des capillaires cérébraux demeure sans contredit sa perméabilité extrêmement faible vis-à-vis des ions et protéines plasmatiques, ce qui lui confère une résistance électrique transendothéliale nettement supérieure à celle des autres endothéliums (Weiss et al., 2009a).

Phénotypiquement, il n'existe que très peu de marqueurs qui soient spécifiques aux cellules endothéliales de la BHE, la plupart étant également exprimés par l'endothélium en périphérie, par les cellules épithéliales ou par d'autres composantes du SNC (Prat et al., 2001). Le marqueur biochimique le mieux caractérisé et le plus communément utilisé pour identifier les cellules endothéliales des capillaires cérébraux est le facteur von Willebrand. Il s'agit d'une glycoprotéine multimérique de haut poids moléculaire synthétisée par les cellules endothéliales, mais également stockée dans les granules des plaquettes et impliquée dans la coagulation plasmatique (Ruggeri, 2003). Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux se lient de manière spécifique à la lectine végétale extraite de l'ajonc épineux d'Europe *Ulex europaeus*, qui fait donc aussi fonction de marqueur pour l'endothélium cérébral (Mazzetti et al., 2004; Prat et al., 2001). La glycoprotéine HT7 (connue chez l'humain sous le nom EMMPRIN, de l'anglais *extracellular matrix metalloproteinase inducer*), de même que le transporteur de glucose GLUT-1, l'antigène CD31 (ou PECAM-1 pour *platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*),

la VE-cadhérine (*vascular endothelial cadherin* ou CD144) et le récepteur à l'angiopoïétine 1 Tie-2 (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains ou CD202B) sont également exprimés à la surface de l'endothélium vasculaire cérébral (Wolburg et al., 2009). Finalement, la cavéoline-1 constitue un autre marqueur caractéristique des cellules endothéliales de la BHE (Wolburg et al., 2009). C'est une composante majeure des cavéoles, que l'on définit comme des invaginations de la membrane plasmique formant des micro-domaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides appelés radeaux lipidiques (Song et al., 2007). La protéine cavéoline-1, exprimée dans le cerveau principalement au niveau de l'endothélium (Nag et al., 2007), s'associe aux jonctions serrées dans les radeaux lipidiques de la BHE et régule la transcytose et la perméabilité vasculaire (Dodelet-Devillers et al., 2009).

La membrane basale

La membrane basale sur laquelle reposent les cellules endothéliales de la BHE sépare les pieds astrocytaires de l'endothélium vasculaire. Elle est produite par les péricytes qui y sont enchâssés, par les cellules endothéliales et les astrocytes. La membrane basale des capillaires cérébraux est une matrice extracellulaire spécialisée qui a une structure tri-lamellaire constituée principalement de collagène de type IV, de protéoglycane héparan-sulfate, de laminines et de fibronectine (Farkas and Luiten, 2001; Weiss et al., 2009b). Elle sert de système d'ancrage pour les cellules endothéliales via l'interaction entre les protéines matricielles et les intégrines exprimées par l'endothélium vasculaire (Hynes, 1992). Ces interactions entre la membrane basale et les cellules endothéliales permettent l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire (Hawkins and Davis, 2005). Outre sa fonction structurelle d'assise pour les cellules endothéliales, la membrane basale agit comme filtre sélectif qui contrôle le passage des macromolécules à travers la BHE (Prat et al., 2001).

Les péricytes

Les péricytes sont d'importants constituants de l'unité neurovasculaire qui appartiennent à la lignée des cellules musculaires lisses. On les retrouve au niveau de l'endothélium vasculaire de nombreux organes mais ils sont particulièrement

abondants au sein des capillaires cérébraux, où l'on estime que le ratio péricytes : cellules endothéliales est d'environ 1 : 3 (Allt and Lawrenson, 2001; Zlokovic, 2008). L'absence de marqueur spécifique permettant d'identifier les péricytes a longtemps entravé les études sur le rôle de ces cellules. Néanmoins, leur proximité étroite avec les cellules endothéliales suggère une possible contribution dans la physiologie de la BHE. À ce propos, il a été démontré que l'ajout de péricytes à des co-cultures de cellules endothéliales et d'astrocytes induit la formation de structures qui évoquent celles des capillaires (Ramsauer et al., 2002), ce qui atteste de l'importance des péricytes dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux (Hellstrom et al., 2001). Une étude de 2010 révèle par ailleurs une augmentation de la perméabilité de la BHE accompagnée d'une hausse de la transcytose endothéliale chez des souris adultes déficientes en péricytes (Armulik et al., 2010). Finalement, les péricytes interviennent également dans la formation de la membrane basale en synthétisant du collagène, des laminines et des protéoglycanes (Allt and Lawrenson, 2001).

Les astrocytes

Parmi les composantes de l'unité neurovasculaire qui contribuent à l'étanchéité de la BHE, il est important de souligner le rôle des astrocytes, qui interagissent de manière constante avec les cellules endothéliales afin de maintenir l'homéostasie au sein du SNC. Les astrocytes, qui doivent leur nom à leur forme étoilée, représentent le type cellulaire le plus abondant du SNC (He and Sun, 2007). Leurs prolongements radiaires ou « pieds astrocytaires » recouvrent la surface des capillaires cérébraux formant un manchon quasi-continu le long de ces vaisseaux (Abbott et al., 2006). Les astrocytes ne sont séparés des cellules endothéliales que par la membrane basale. Cette proximité anatomique entre les deux types cellulaires laisse encore une fois présumer une participation active des astrocytes dans l'induction des propriétés de la BHE. Cette fonction est d'ailleurs aujourd'hui bien documentée (Alvarez et al., 2013). De fait, des expériences menées *in vitro* démontrent que les astrocytes sont capables de restaurer certaines propriétés des cellules endothéliales cérébrales que celles-ci perdent lorsque mises en culture seules. Citons à ce titre l'expression du marqueur enzymatique γ -glutamyl transférase et la glycoprotéine P (Abbott et al., 2006; Hayashi et al., 1997). Le contact des astrocytes avec les cellules endothéliales dans un système de co-culture

permet également de moduler l'expression des molécules de jonctions serrées et adhérentes (Dehouck et al., 1990; Rubin et al., 1991) ou encore celle du transporteur de glucose GLUT-1 (Abbott et al., 2006; McAllister et al., 2001). L'ajout de milieu conditionné par les astrocytes, quant à lui, induit une résistance électrique élevée dans les cultures primaires de cellules endothéliales, ce qui suggère que les astrocytes sécrètent des facteurs solubles qui contribuent à promouvoir l'intégrité de la BHE (Prat et al., 2001). Même si les bases moléculaires de cette activité ne sont pas clairement établies, plusieurs médiateurs ont été évoqués, notamment le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF de l'anglais *glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Igarashi et al., 1999), le *transforming growth factor* (TGF)- β (Garcia et al., 2004), l'angiotensine II (Wosik et al., 2007) et une protéine impliquée dans la voie de signalisation *Hedgehog* (Alvarez et al., 2011b). Ainsi, les astrocytes, dont on connaît par ailleurs le rôle essentiel au cours du développement embryonnaire neuronal ou dans le contrôle de l'homéostasie cérébrale, participent également directement à l'induction et au maintien des propriétés de la BHE.

Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont considérées comme les macrophages résidents spécifiques du SNC. D'un point de vue ontogénique, elles se distinguent toutefois des autres cellules myéloïdes comme les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques du fait qu'elles ne proviennent pas de la moelle osseuse mais seraient plutôt issues de précurseurs présents principalement dans le sac vitellin (Ginhoux et al., 2010; Gomez Perdiguero et al., 2015). Les cellules microgliales colonisent le SNC à un stade précoce du développement embryonnaire et représentent environ 5 à 20% de la population gliale du cerveau (Lawson et al., 1990). À l'instar des macrophages tissulaires, leur fonction principale consiste à phagocyter et éliminer les débris cellulaires. En conditions physiologiques, les cellules microgliales ont un corps cellulaire de petite taille et sont munies de nombreux prolongements ramifiés. Elles agissent alors essentiellement de sentinelles, comme première ligne de défense immunitaire au sein du SNC (Nimmerjahn et al., 2005). Lorsqu'elles sont stimulées, elles adoptent une morphologie amiboïde et un phénotype analogue à celui des macrophages activés (résumé dans l'article de revue (Greter et al., 2015)). Les cellules microgliales

entretiennent des relations réciproques dynamiques avec les autres composantes de l'unité neurovasculaire incluant les neurones, les astrocytes (Colonna and Butovsky, 2017) et les cellules endothéliales (da Fonseca et al., 2014).

2.2 Les complexes de jonctions intercellulaires

La présence de jonctions intercellulaires étanches constitue une caractéristique essentielle de l'endothélium des capillaires cérébraux, en grande partie responsable de la perméabilité restreinte de la BHE (Wolburg and Lippoldt, 2002). Les jonctions intercellulaires sont de gros complexes moléculaires impliquant des protéines transmembranaires et cytoplasmiques dont les portions extracellulaires interagissent de façon homophile ou hétérophile afin de sceller l'espace entre les cellules endothéliales. Des protéines intracellulaires relient ces complexes moléculaires aux microfilaments d'actine qui forment le cytosquelette, de manière à renforcer l'adhésion entre les cellules endothéliales (Hawkins and Davis, 2005).

Les complexes moléculaires qui caractérisent l'espace interendothélial de la BHE comprennent des jonctions serrées et adhérentes (Figure 5). Une désorganisation au niveau de ces jonctions intercellulaires peut induire une augmentation de perméabilité de l'endothélium des capillaires cérébraux, et par conséquent une perte de sa fonction de barrière.

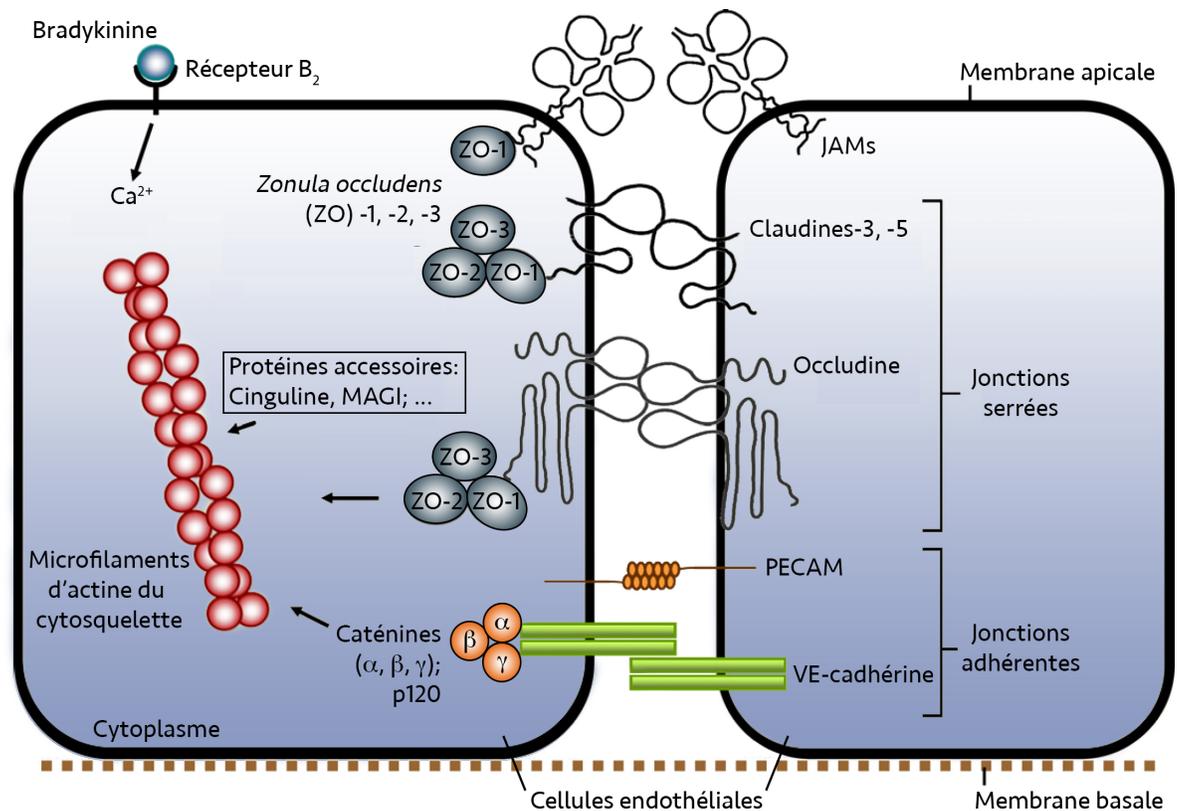


Figure 5. Structure moléculaire des jonctions serrées et adhérentes de la BHE. Les jonctions serrées sont des complexes macromoléculaires situés aux zones de contact membranaires des cellules endothéliales. Parmi les protéines constitutives des jonctions serrées de la BHE, on compte l'occludine, les claudines -3 et -5 et les molécules JAM (*junctional adhesion molecule*). Les domaines cytoplasmiques de ces protéines transmembranaires se lient à une famille de partenaires cytosoliques, comme les *zonula occludens* (ZO) -1, -2 et -3 et la cinguline, elles-mêmes responsables de l'ancrage des jonctions serrées aux microfilaments d'actine du cytosquelette. Quant à la VE-cadhérine, une jonction adhérente spécifique de l'endothélium vasculaire de la BHE, elle se lie au cytosquelette d'actine via les caténines α , β et γ . Reproduit avec la permission de Elsevier (Abbott et al., 2010).

Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont les éléments les plus apicaux des complexes intercellulaires de la BHE. Elles forment une ceinture continue qui agit comme une « fermeture éclair », séparant la face luminale du domaine basolatéral de l'endothélium (Forster, 2008; Hawkins and Davis, 2005). Les jonctions serrées sont donc directement responsables du maintien de la polarité des cellules endothéliales de la BHE, régulent la perméabilité paracellulaire et interviennent également dans le transfert de signaux intracellulaires (Forster, 2008). On répertorie au moins trois

types de protéines transmembranaires constitutives des jonctions serrées de la BHE : l'occludine, les claudines et les molécules JAM (*junctional adhesion molecule*).

L'occludine est une protéine transmembranaire d'environ 65 kiloDalton (kDa) fortement exprimée au niveau des cellules endothéliales de la BHE, tandis que sa distribution est beaucoup plus éparse dans l'endothélium des tissus non-cérébraux (Hawkins and Davis, 2005). Il existe une corrélation positive entre l'expression d'occludine et les mesures de résistance électrique transcellulaire (McCarthy et al., 1996), ce qui suggère un rôle primordial de cette molécule dans la régulation des propriétés de la BHE. En outre, elle n'est pas indispensable à l'établissement des jonctions serrées à proprement parler puisque les souris déficientes en occludine ne présentent pas de défaut au niveau de l'organisation des complexes jonctionnels des capillaires cérébraux (Saitou et al., 2000). Néanmoins, une baisse dans les niveaux d'expression d'occludine est associée à un dysfonctionnement de la BHE dans de nombreuses conditions pathologiques (Hawkins and Davis, 2005) incluant la SEP (Plumb et al., 2002).

Les claudines, quant à elles, sont des constituants essentiels qui forment la charpente du complexe jonctionnel multi-protéique. Elles appartiennent à une famille qui compte actuellement 24 membres. Ce sont de petites protéines transmembranaires ayant un poids moléculaire qui se situe entre 20 et 24 kDa (Forster, 2008; Hawkins and Davis, 2005). Elles possèdent un profil d'expression variable en fonction des tissus ; les claudines-3, -5 et -12 étant détectées au niveau de l'endothélium de la BHE (Wolburg et al., 2009). À titre comparatif, l'épithélium des plexus choroïdes exprime les claudines-2, -3 et -11, mais pas la claudine-5 (Engelhardt and Sorokin, 2009). Cette dernière s'avère jouer un rôle particulièrement important dans l'établissement des propriétés de la BHE comme l'atteste la perméabilité accrue de la BHE envers les petites molécules chez les souris déficientes en claudine-5 (Nitta et al., 2003).

La troisième classe de jonctions serrées comprend des protéines transmembranaires de la superfamille des Ig dont les molécules **JAM**, ESAM (*endothelial cell-selective adhesion molecule*), CAR (*coxsaie- and adenovirus*

receptor) et CLMP (*CAR-like membrane protein*) (Engelhardt and Sorokin, 2009; Forster, 2008). À ce jour, cinq isoformes des molécules JAM ont été identifiées (JAM-1, -2, -3, -4 et -L). JAM-1 et ESAM sont toutes deux détectées au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux. Toutefois, leur contribution au maintien des propriétés de la BHE reste à éclaircir (Engelhardt and Sorokin, 2009). En revanche, il a été démontré que JAM-1 pouvait intervenir avec les intégrines leucocytaires tel LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1* ou CD11a) et faciliter ainsi la migration des cellules immunitaires à travers l'endothélium de la BHE (Weber et al., 2007).

Les molécules transmembranaires occludine, claudines et JAM interagissent via leur domaine cytoplasmique avec un ensemble de protéines accessoires qui, à leur tour, sont impliquées dans diverses fonctions de signalisation cellulaire. Les protéines accessoires comme la cinguline et les protéines intra-cytoplasmiques de la *Zonula occludens* (ZO)-1, -2 et -3 appartenant à la famille des *membrane-associated guanylate kinase* ou MAGUK, offrent également un support structurel aux jonctions serrées en reliant celles-ci aux microfilaments d'actine du cytosquelette (Wolburg and Lippoldt, 2002). La présence de ZO-1 au sein de l'endothélium cérébral est essentielle à la stabilisation, la régulation et l'assemblage des jonctions serrées. En effet, sa dissociation du complexe multiprotéique jonctionnel est associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE (Hawkins and Davis, 2005).

Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont présentes de manière ubiquitaire dans l'endothélium vasculaire et sont entre autres responsables de l'adhésion entre cellules adjacentes et de l'inhibition de la croissance par contact intercellulaire (Bazzoni and Dejana, 2004; Hawkins and Davis, 2005). En dehors de l'endothélium vasculaire cérébral, on accorde aux jonctions adhérentes un rôle essentiel dans le maintien de la perméabilité paracellulaire, tandis que cette fonction serait considérée plus accessoire au niveau de la BHE (Engelhardt and Sorokin, 2009). Les cadhérines sont les principales composantes de ce type de jonctions ; la VE-cadhérine (*vascular endothelial cadherin* ou CD144) étant un marqueur spécifique des cellules endothéliales. Les cadhérines s'associent via leur domaine cytoplasmique à des partenaires intracellulaires, notamment les caténines qui leur fournissent un ancrage

avec le cytosquelette d'actine (Ballabh et al., 2004). Le rôle des jonctions adhérentes demeure toutefois un champ d'études relativement inexploré, particulièrement en ce qui a trait à leur contribution vis-à-vis des modifications physiologiques de la BHE inhérentes à certaines affections neurologiques (Zlokovic, 2008).

Finalement, l'actine, bien qu'elle ne soit définie ni comme une protéine des jonctions serrées ni comme une jonction adhérente, intervient dans la formation du complexe multi-protéique jonctionnel et dans le maintien des propriétés de la BHE. La réorganisation des microfilaments d'actine du cytosquelette et leur interaction directe avec les molécules des jonctions serrées et adhérentes jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité de l'endothélium cérébral (Zlokovic, 2008).

2.3 Modèle *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique humaine

Culture primaire de cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux

Dans un désir d'étudier le fonctionnement de l'unité neurovasculaire à l'état physiologique, et afin de mieux appréhender les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régulent la fragilisation de la BHE dans le contexte neuroinflammatoire caractérisant la SEP, le Dr Prat a mis au point un modèle *in vitro* de la BHE humaine (Prat et al., 2001). Une grande partie des travaux de recherche du laboratoire, incluant ceux décrits dans cette thèse, prennent appui sur ce modèle. Il se base sur la culture primaire de cellules endothéliales de capillaires cérébraux provenant de tissus humains. Ce modèle *in vitro* offre l'avantage de retenir un bon nombre des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de la BHE *in vivo*, telles l'expression de marqueurs endothéliaux, la présence de jonctions serrées et une perméabilité restreinte envers des molécules de référence (Prat et al., 2001). Il permet par ailleurs d'évaluer la contribution individuelle d'un type cellulaire ou d'une molécule donnée dans la régulation des fonctions de la BHE, tout en s'affranchissant de l'influence des autres cellules.

Les échantillons de tissu sain à partir desquels nous isolons les cellules endothéliales cérébrales qui servent à la modélisation de la BHE humaine proviennent de biopsies effectuées chez des patients atteints d'épilepsie. Une fois

les méninges soigneusement retirées, l'échantillon de tissu cérébral est broyé et homogénéisé. Plusieurs étapes de filtration successives permettent d'enrichir la préparation en microvaisseaux issus de capillaires et d'en séparer les plus gros vaisseaux. Une digestion enzymatique avec la collagénase sert à isoler et dissocier les cellules endothéliales. Celles-ci sontensemencées dans des puits préalablement couverts d'une fine couche de gélatine qui fait fonction de matrice extracellulaire. Les cellules sont mises en culture dans un milieu spécialement conçu afin de conserver le maximum de caractéristiques de la BHE, jusqu'au 7^{ième} passage cellulaire (Cayrol et al., 2011; Prat et al., 2001). D'ordinaire, la culture s'effectue en présence de milieu conditionné par les astrocytes, en raison de l'effet inducteur de ces derniers sur la perméabilité restrictive de la BHE et sur l'expression des jonctions serrées par les cellules endothéliales (Dehouck et al., 1990; Prat et al., 2001; Rubin et al., 1991).

Mesure de la résistance électrique transendothéliale et de la perméabilité in vitro

Il existe diverses méthodes permettant d'évaluer l'intégrité de la BHE dans le modèle *in vitro* décrit ci-dessus. Grâce aux techniques de microscopie et de cytométrie en flux, on s'assure de l'expression et de l'organisation des jonctions serrées ainsi que celles de marqueurs endothéliaux spécifiques. La perméabilité paracellulaire de la monocouche de cellules endothéliales peut ensuite être établie par mesure de la résistance électrique transendothéliale ou TEER (de l'anglais *transendothelial electrical resistance*). Ce paramètre est un indicateur du degré d'organisation des jonctions serrées ; la valeur de TEER étant inversement corrélée avec la perméabilité de l'endothélium. L'inconvénient majeur d'une telle méthode est que les mesures de TEER varient grandement en fonction du type d'appareillage utilisé et sont donc peu reproductibles entre différents laboratoires, voire parfois au sein d'une même équipe. On estime cependant que les microvaisseaux de la BHE devraient idéalement afficher une valeur de TEER qui avoisine ou dépasse les 1000 Ohms \times cm² (Deli et al., 2005).

Une autre méthode visant à évaluer l'intégrité de la BHE dans le modèle *in vitro* consiste à mesurer la diffusion à travers la monocouche de cellules endothéliales, de traceurs moléculaires marqués à l'aide de fluorochromes ou d'isotopes

radioactifs. Pour ce faire, les cellules endothéliales sont mises en culture en chambre de Boyden, sur la surface d'un filtre microporeux tapissé au préalable d'une couche de gélatine (Figure 6). L'insert de la chambre de Boyden permet de délimiter deux compartiments. La perméabilité est mesurée en quantifiant au cours du temps la diffusion active d'un traceur, à partir de la chambre supérieure vers le compartiment inférieur. C'est cette méthode que nous avons préconisée dans le cadre de l'étude décrite dans le premier article annexé à cette thèse. Nous nous sommes servis de l'albumine marquée avec un dérivé de la fluorescéine, le FITC (pour *fluorescein isothiocyanate*), comme molécule de référence.

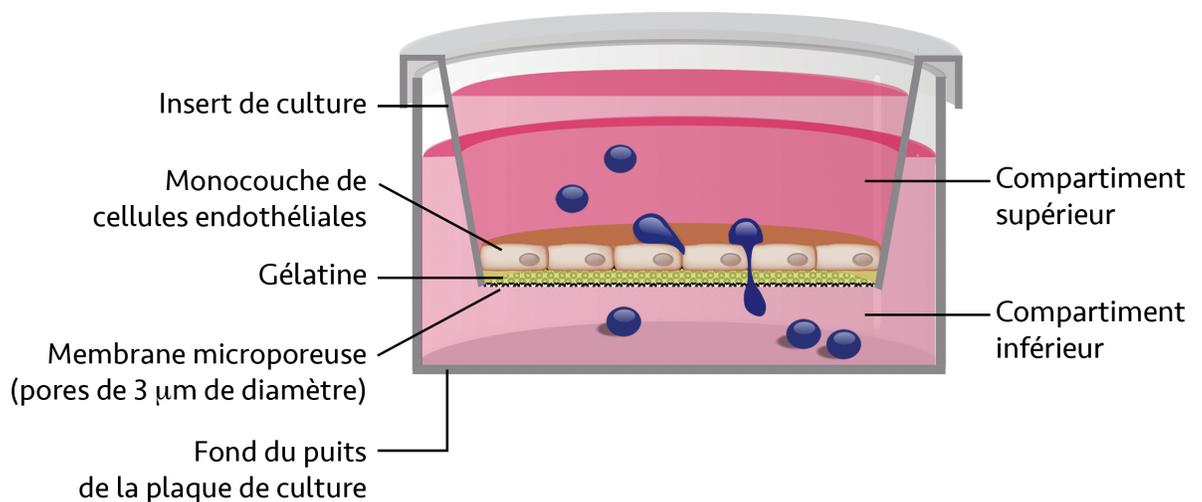


Figure 6. Modèle *in vitro* de la BHE humaine. Des cellules endothéliales provenant de la culture primaire de micro-capillaires cérébraux humains sont ensemencées sur une membrane poreuse recouverte d'une fine couche de gélatine qui fait fonction de matrice extracellulaire. Les cultures de cellules endothéliales sont généralement supplémentées avec du milieu conditionné par les astrocytes afin d'induire et renforcer les propriétés de perméabilité restrictive de la BHE. Schéma conçu et réalisé par Dr Liesbeth de Jong.

2.4 Modification des propriétés physiologiques de la barrière hémocéphalique dans la sclérose en plaques

La fragilisation de la BHE est une étape décisive dans la formation des lésions de SEP et l'évolution de la maladie. Elle s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'infiltration de cellules immunes actives dans le SNC. Il s'ensuit une réaction inflammatoire excessive au cours de laquelle d'autres leucocytes sont recrutés dans le cerveau et qui culmine par la formation des plaques

de démyélinisation caractéristiques de la SEP (McFarland and Martin, 2007; Minagar and Alexander, 2003). La présence d'infiltrats péri-vasculaires au sein des lésions actives de SEP conforte l'hypothèse selon laquelle une brèche de la BHE serait primordiale dans la progression de la maladie. La rupture de la BHE peut être visualisée en imagerie par résonance magnétique suite à l'injection intraveineuse de gadolinium, un produit de contraste (Arnold and Matthews, 2002).

Le relâchement, la désorganisation ou un changement dans les niveaux d'expression des jonctions intercellulaires semblent être des facteurs importants à l'origine de la fragilisation de la BHE en SEP (Bednarczyk and Lukasiuk, 2011). Par exemple, la déphosphorylation de l'occludine, une protéine de jonction serrée qu'on sait importante dans l'intégrité de la BHE, semble corrélée avec l'apparition de signes cliniques d'EAE chez le rat (Morgan et al., 2007). Une baisse de l'expression de claudine-3 est par ailleurs observée au niveau des capillaires cérébraux formant la BHE chez les souris atteintes d'EAE (Wolburg et al., 2003). L'étude anatomopathologique de coupes de cerveaux prélevés en post mortem sur des sujets atteints de SEP démontre aussi une perte de l'expression des protéines de jonction occludine et ZO-1 au niveau des microvaisseaux de la BHE (Kirk et al., 2003; Plumb et al., 2002).

De nombreux médiateurs inflammatoires et cascades moléculaires conduisent à une augmentation de la perméabilité de la BHE dans la SEP. L'IFN- γ , le TNF, l'IL-1 β et le MCP-1 (pour *monocyte chemoattractant protein-1*) /CCL2 sont autant de facteurs mis en cause dans l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium cérébral et auxquels on attribue un effet possiblement délétère dans la SEP. L'IFN- γ et le TNF agissent de concert en influençant l'arrangement spatial des protéines de jonctions serrées JAM-1 et claudine-5 par les cellules endothéliales (Alvarez et al., 2011a). La hausse des niveaux d'expression de TNF et d'IL-1 β va de pair avec une augmentation de la perméabilité de la BHE chez les souris EAE (Forster, 2008). Finalement, une perte de l'expression de ZO-1 est observée dans des cultures de cellules endothéliales humaines en réponse à un traitement avec la chimiokine MCP-1/CCL2 (Song and Pachter, 2004).

En ce qui a trait aux constituants de la membrane basale, ils peuvent également être dégradés par des enzymes de la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP). Un dérèglement au niveau de l'expression des MMP, observé dans diverses affections physiopathologiques, entraîne la relâche de l'ancrage des cellules endothéliales, affecte l'expression des jonctions serrées et l'intégrité de la BHE (Carvey et al., 2009). Plusieurs études soulignent l'importance de ces endopeptidases dans la pathologie de la SEP. Ainsi, l'expression des MMP-2, -3, -7, -9 et -12 est plus forte dans les tissus cérébraux de patients atteints de SEP que dans ceux de sujets sains (Yong et al., 2001). De même, la concentration de MMP-9 s'accroît dans le LCR lors des poussées de la maladie et coïncide avec la présence de lésions, détectées en imagerie par résonance magnétique (Waubant et al., 1999).

La fragilisation de la BHE facilite également l'afflux de cellules immunitaires dans le SNC. C'est assurément une des conséquences les plus manifestes de la perte d'intégrité de la BHE dans la SEP. Néanmoins, l'infiltration de leucocytes dans le SNC peut se produire même sans perturbation notable des complexes de jonctions intercellulaires de la BHE. Il incombe donc de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui gouvernent le processus de migration des cellules immunitaires à travers l'endothélium cérébral afin de restreindre la propagation de la réaction inflammatoire qui conduit à la formation des lésions de SEP.

3. Migration des cellules immunitaires à travers l'endothélium cérébral

Le SNC est souvent considéré comme un site clos et immunologiquement quiescent, quoiqu'il soit soumis à une surveillance immunitaire constante en conditions physiologiques. En dépit de cette immunosurveillance, le trafic leucocytaire à partir du sang vers le SNC demeure relativement minime par rapport à celui observé dans les autres organes. Cette propriété permet de limiter les dommages potentiellement causés par l'inflammation, au vu de la faible capacité de régénération anatomique et fonctionnelle des constituants du SNC (Cayrol et al., 2011). Le concept d'immuno-privilège ne reflète donc pas tant l'absence totale de système immunitaire au sein de l'environnement cloisonné du SNC mais plutôt la stricte régulation du processus de migration cellulaire à travers l'endothélium cérébral. En effet, le passage des cellules de la circulation sanguine vers le SNC est finement régulé au niveau de l'unité neurovasculaire, tant en situation homéostatique qu'inflammatoire. À ce propos, il est admis aujourd'hui que les cellules endothéliales de la BHE jouent un rôle actif particulièrement important à différentes étapes du recrutement leucocytaire (Greenwood et al., 2011). Une meilleure caractérisation des partenaires moléculaires impliqués dans les interactions entre le système immunitaire et l'endothélium vasculaire cérébral s'avère donc cruciale pour l'étude et la compréhension des dérèglements qui surviennent dans les désordres inflammatoires comme ceux de la SEP. C'est dans ce contexte que s'inscrit le développement de stratégies thérapeutiques comme le natalizumab, dont le principal mode d'action proposé est de limiter l'infiltration leucocytaire dans le SNC. L'efficacité prouvée de cette approche thérapeutique dans la SEP démontre à quel point la migration des cellules immunes actives à travers la BHE est une composante importante de l'inflammation cérébrale au cours de la maladie (Ransohoff, 2007). Le présent chapitre sera donc entièrement consacré à la description du processus de transmigration des leucocytes à travers la BHE et des principaux acteurs moléculaires impliqués dans les interactions entre l'endothélium vasculaire cérébral et les cellules immunitaires.

3.1 Les étapes de la migration leucocytaire à travers la barrière hémocéphalique

Le processus de transmigration leucocytaire à travers l'endothélium vasculaire a été bien décrit et est généralement considéré de manière analogue au niveau de la BHE. Il fait intervenir une cascade complexe d'interactions moléculaires mettant en jeu des molécules d'adhérence présentes à la fois sur les leucocytes circulants et sur les cellules endothéliales, ainsi que des chimiokines et autres facteurs d'activation. Le modèle proposé par Springer en 1994 qui détaille le passage des leucocytes à partir du sang vers les tissus discerne quatre étapes successives illustrées à la figure 7 : 1) le roulement des leucocytes sur la paroi de l'endothélium vasculaire, 2) l'activation des intégrines leucocytaires en réponse à divers médiateurs inflammatoires, 3) l'adhérence ferme des leucocytes aux cellules endothéliales et 4) la transmigration ou diapédèse (Springer, 1994). Chacune de ces étapes est minutieusement régulée et représente par conséquent un point de contrôle de la cascade d'adhérence leucocytaire.

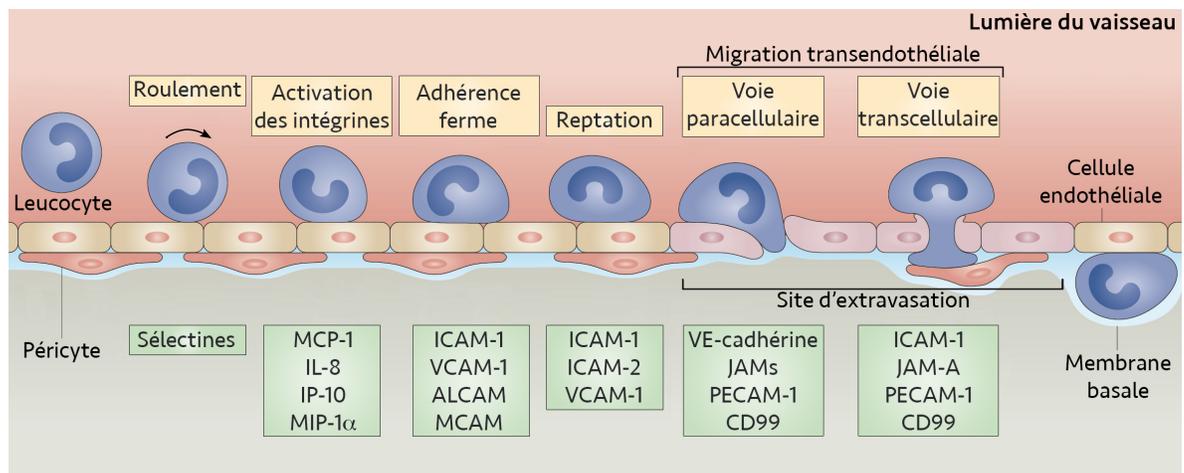


Figure 7. Molécules impliquées dans la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire. Ce schéma décrit les étapes du processus de migration transendothéliale des leucocytes à travers la BHE. Chacune des étapes fait intervenir successivement différentes familles de molécules d'adhérence. Reproduit avec la permission de Nature Publishing Group (Vestweber, 2015).

Le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire

Le contact initial des leucocytes à la surface de l'endothélium vasculaire en est un transitoire et réversible qui dépend principalement de l'expression des sélectines

(Engelhardt, 2006). Ces dernières sont des glycoprotéines transmembranaires dont l'expression est restreinte au système vasculaire et aux leucocytes. La famille des sélectines (CD62) comprend trois membres : L-sélectine, P-sélectine et E-sélectine. La L-sélectine est exprimée de manière constitutive par la majorité des leucocytes circulants et sert également de marqueur d'activation des lymphocytes T ; les lymphocytes T naïfs (CD45RA) et les T mémoires centraux exprimant de hauts niveaux de CD62L, tandis que les lymphocytes T mémoires effecteurs affichent plutôt un phénotype CD62L^{low} (Sallusto et al., 1999). La P-sélectine est emmagasinée dans les granules des plaquettes et est exprimée par les cellules endothéliales, surtout en réponse à une stimulation avec des médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF et le lipopolysaccharide (LPS) (Gotsch et al., 1994). Il est à noter que contrairement aux cellules endothéliales des méninges et des plexus choroïdes, l'endothélium des microvaisseaux de la BHE n'exprime pas de P-sélectine en conditions physiologiques (Engelhardt, 2008). Quant à la E-sélectine, elle est présente exclusivement à la surface des cellules endothéliales. À l'instar de la P-sélectine, son expression est augmentée en conditions inflammatoires, notamment suite à l'activation de l'endothélium avec les cytokines telles que l'IL-1, l'IFN- γ et le TNF (Kubes and Ward, 2000).

Les interactions entre les sélectines et leurs ligands oligosaccharidiques sont de nature relativement faible, ce qui permet aux leucocytes de ralentir leur vitesse au contact des cellules endothéliales et de rouler le long de l'endothélium vasculaire, dans la direction du flux sanguin (Engelhardt, 2006). Parmi les ligands des sélectines, le PSGL-1 (pour *P-selectin glycoprotein ligand-1*) est exprimé à l'état basal sur l'ensemble des leucocytes et se lie aussi bien à la P-sélectine qu'aux sélectines E et L. Outre PSGL-1, l'ESGL-1 (*E-selectin glycoprotein ligand-1*), comme son nom l'indique, est un récepteur spécifique pour la E-sélectine. Quant à la L-sélectine, on lui reconnaît plusieurs ligands dont GlyCAM-1 (*glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*), MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) et CD34 (Kelly et al., 2007).

L'activation des intégrines leucocytaires

Le roulement des leucocytes leur permet de sonder la surface endothéliale à la recherche de facteurs d'activation qui favoriseront un ancrage plus ferme aux cellules endothéliales. Cette deuxième étape de la cascade d'adhérence requiert l'activation rapide d'une autre classe structurale de molécules à la surface des leucocytes, les intégrines, qui interagissent avec leurs ligands de la superfamille des Ig exprimés sur l'endothélium. L'activation des intégrines leucocytaires est une étape incontournable qui immobilise le leucocyte sur la paroi endothéliale. Elle est dictée principalement par la sécrétion locale de signaux chimiotactiques (Engelhardt and Ransohoff, 2012). Les chimiokines exercent des effets chimiotactiques sur des populations cellulaires particulières. Par exemple, l'IL-8/CXCL8 cible spécifiquement le recrutement des polynucléaires neutrophiles (Semple et al., 2010) tandis qu'IP-10 (*interferon- γ -inducible protein 10*)/CXCL10 attire les lymphocytes T et les cellules *natural killer* (NK) (Wilson et al., 2010). Quant à la chimiokine MCP-1/CCL2, elle facilite l'adhésion des monocytes à l'endothélium, mais agit également sur les lymphocytes T activés mémoires (Mahad et al., 2006; Prat et al., 2002).

Les chimiokines les plus souvent mises en cause dans le recrutement leucocytaire à travers la BHE sont MCP-1/CCL2, l'IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 α*)/CCL3 et RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*)/CCL5. En sécrétant ces chimiokines, surtout en conditions inflammatoires, les cellules endothéliales de la BHE orchestrent elles-mêmes le recrutement de cellules immunitaires au sein du SNC (Alvarez et al., 2011a).

Dans la SEP, l'intérêt s'est porté essentiellement sur l'expression des chimiokines (et récepteurs correspondants) qui contrôlent le recrutement des lymphocytes T CD4⁺, compte tenu du rôle prépondérant attribué à ce type cellulaire dans la physiopathologie de la SEP et de l'EAE. À ce propos, on rapporte une augmentation de l'expression des chimiokines MIP-1 α /CCL3 (Miyagishi et al., 1995), IP-10/CXCL10 et RANTES/CCL5 au sein des lésions de SEP et dans le LCR recueilli au cours de poussées de la maladie (Balashov et al., 1999; Boven et al., 2000; Sorensen et al., 1999). Les travaux sur le modèle animal de l'EAE démontrent par

ailleurs que les souris chez lesquelles le gène *Ccr2* a été inactivé, soit le récepteur spécifique de la chimiokine MCP-1/CCL2, ne développent pas la maladie (Fife et al., 2000; Izikson et al., 2000). Finalement, la contribution du récepteur de chimiokine CCR6 et de son ligand unique MIP-3 α /CCL20 dans l'évolution de l'EAE a également fait l'objet de nombreuses recherches dont les résultats se sont toutefois avérés contradictoires. De fait, l'étude de Reboldi *et al.* démontre que les souris déficientes en CCR6 ne sont pas susceptibles à l'EAE (Reboldi et al., 2009), alors que d'autres groupes n'observent qu'un retard dans le déclenchement de la maladie et l'apparition des symptômes chez ces animaux (Yamazaki et al., 2008), voire même aucun effet bénéfique sur le développement de l'EAE suite à l'inactivation de CCR6 (Elhofy et al., 2009; Villares et al., 2009). Fait intéressant, l'équipe de Sallusto rapporte une expression constitutive de MIP-3 α /CCL20 par l'épithélium des plexus choroïdes chez la souris et chez l'humain, faisant de cette zone anatomique une voie d'accès au SNC privilégiée pour les leucocytes dont le recrutement dépend de l'interaction CCR6–MIP-3 α /CCL20 (Reboldi et al., 2009).

L'adhérence ferme des leucocytes avec l'endothélium

L'activation des intégrines leucocytaires permet de remplacer les liaisons labiles entre la cellule immunitaire et l'endothélium vasculaire par des interactions de haute affinité. Cette étape est un prérequis pour la migration dirigée des leucocytes vers le tissu. Les intégrines activées se lient aux membres de la superfamille des Ig exprimés par les cellules endothéliales, entraînant du même coup l'arrêt du leucocyte et son attachement ferme à l'endothélium vasculaire (Engelhardt and Ransohoff, 2012).

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques formées d'une chaîne α et d'une sous-unité β liées de façon non-covalente. La combinaison particulière des différentes sous-unités α et β confère la spécificité des intégrines pour leur ligand (Hynes, 2002). Les intégrines communément impliquées dans les interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales du SNC sont LFA-1 (ou CD11a/CD18) qui est formée de l'hétérodimère α L β 2 ; Mac-1 (*macrophage-1 antigen*, aussi appelée CD11b/CD18) constituée des sous-unités α M et β 2 est exprimée principalement par les cellules myéloïdes ; VLA-4 (*very late*

antigen-4 ou CD49d/CD29) composée des chaînes $\alpha 4\beta 1$; et l'intégrine LPAM-1 (*lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule-1*) constituée des sous-unités $\alpha 4\beta 7$ (Man et al., 2007). Trois ligands endothéliaux principaux ont été décrits pour ces intégrines : ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ou CD54) qui interagit avec LFA-1 et avec Mac-1 ; VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, ou CD106) qui intervient dans la liaison avec VLA-4 mais aussi avec LPAM-1 ; et finalement MAdCAM-1, qui est un autre ligand de LPAM-1 (Luster et al., 2005). Il convient de mentionner que VLA-4 peut également interagir avec des composants de la matrice extracellulaire, comme le fragment CS-1 (*connecting segment-1*) de la fibronectine (Rice et al., 2005).

Les travaux de recherche du Dr Prat et de son équipe ont mis en lumière la contribution de plusieurs autres molécules d'adhérence cellulaire présentes sur les cellules endothéliales de la BHE. On compte parmi celles-ci Ninjurin-1 (*nerve injury-induced protein-1*), qui contrôle la migration transendothéliale des cellules immunitaires de la lignée myéloïde via une interaction homophile (Ifergan et al., 2011). ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule* ou CD166) participe au recrutement des monocytes, des lymphocytes B et T CD4⁺ au sein du SNC grâce à une interaction homophile ou hétérophile avec le ligand CD6 (Cayrol et al., 2008). Enfin, MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*, ou CD146) qui est présente à la surface d'un sous-groupe de lymphocytes T pathogéniques, faciliterait leur entrée dans le SNC via une interaction avec une molécule MCAM/CD146 exprimée par l'endothélium de la BHE (Larochelle et al., 2012), ou via sa liaison avec la laminine-411 de la matrice extracellulaire (Flanagan et al., 2012).

Les molécules d'adhérence ne sont que très faiblement exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire cérébral quiescent. La plupart d'entre elles voient cependant leur expression fortement stimulée par les cytokines pro-inflammatoires telles l'IFN- γ et le TNF (Wong and Dorovini-Zis, 1992, 1995; Wong et al., 1999). De plus, on dénote dans certaines conditions pathologiques comme la SEP, une modification du patron d'expression des molécules d'adhérence endothéliales qui favorise la migration des leucocytes activés vers le SNC. Par exemple, l'expression accrue d'ICAM-1 est bien documentée sur les cellules endothéliales au sein des

lésions tissulaires du SNC, aussi bien chez les patients atteints de SEP que dans le modèle d'EAE chez les souris malades (Cannella and Raine, 1995; Prendergast and Anderton, 2009; Sobel et al., 1990; Steffen et al., 1994). L'interaction VLA-4-VCAM-1 joue elle aussi un rôle prépondérant dans l'adhérence et la transmigration des leucocytes vers le SNC au cours de la maladie. D'ailleurs dans l'EAE comme dans la SEP, l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne $\alpha 4$ des intégrines diminue le trafic leucocytaire vers le SNC et s'est montrée efficace dans la prévention des poussées et l'apparition de nouvelles lésions (Miller et al., 2003; Yednock et al., 1992). Cet anticorps bloquant empêche la fixation des cellules immunitaires exprimant les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$ sur leurs ligands endothéliaux, les récepteurs VCAM-1 et MAdCAM-1. Bien que VCAM-1 puisse se lier à VLA-4 ou à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, l'interaction $\alpha 4\beta 7$ -VCAM-1 ne semble pas intervenir dans la migration des lymphocytes T à travers la BHE (Engelhardt et al., 1998). Quant à MAdCAM-1, elle est exprimée au niveau du SNC de souris atteintes d'EAE seulement à la surface apicale des cellules épithéliales des plexus choroïdes mais pas sur l'endothélium de la BHE (Steffen et al., 1996). Les molécules d'adhérence ALCAM, Ninjurin-1 et MCAM sont aussi surexprimées par l'endothélium cérébral en réponse à un stimulus inflammatoire et sont détectées *in situ* au niveau des microvaisseaux dans les lésions actives de SEP (Cayrol et al., 2008; Ifergan et al., 2011; Larochelle et al., 2012). En somme, ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1, ALCAM, Ninjurin-1 et MCAM sont toutes impliquées dans le trafic leucocytaire du sang vers le SNC, soit à travers les plexus choroïdes ou via l'endothélium de la BHE. Ces molécules d'adhérence représentent donc des cibles thérapeutiques intéressantes afin de limiter l'infiltration de cellules immunes actives dans le SNC.

La diapédèse

Suite à l'attachement irréversible à la surface luminale de l'endothélium, les cellules immunitaires migrent vers l'espace péri-vasculaire. C'est la diapédèse, qui constitue l'étape finale de la cascade de migration leucocytaire. En revanche, depuis la description initiale faite par Springer en 1994, le paradigme de transmigration leucocytaire à travers l'endothélium vasculaire s'est grandement affiné pour y inclure plusieurs étapes distinctes additionnelles : la reptation du leucocyte sur l'endothélium (*crawling*), puis la formation de protubérances endothéliales qui

enlacent le leucocyte et finalement la diapédèse en tant que telle (Wittchen, 2009). Si les étapes de roulement, d'activation des intégrines et d'adhérence leucocytaire ont été largement étudiées, les mécanismes moléculaires qui contrôlent la reptation et l'extravasation des cellules immunitaires à travers la BHE ne sont pas encore bien caractérisés. Ce n'est que récemment, grâce à l'essor considérable des techniques d'imagerie cellulaire, en particulier de la microscopie biphotonique intravitale, que les chercheurs ont pu visualiser en temps réel les dernières étapes de la cascade de migration leucocytaire.

Peu après l'étape d'adhérence ferme, les cellules immunitaires rampent sur l'endothélium et scannent sa surface à la recherche du site préférentiel de transmigration. Cette étape fait de nouveau intervenir les intégrines (LFA-1, Mac-1, VLA-4) et les membres de la superfamille des Ig, essentiellement ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1. Étonnamment, il a été démontré qu'au niveau de la BHE, les lymphocytes T peuvent parcourir de longues distances (au-delà de 150 μm) durant l'étape de reptation avant de traverser la paroi endothéliale. Les leucocytes semblent aussi y privilégier un mouvement à contre-courant du flux sanguin, ce qui contraste avec les observations faites *in vivo* au niveau l'endothélium des capillaires périphériques (Bartholomaeus et al., 2009; Lyck and Engelhardt, 2012).

Afin de guider le processus de diapédèse, les cellules endothéliales émettent ensuite des prolongements membranaires qui enveloppent le leucocyte fermement accolé à la surface de l'endothélium vasculaire, créant au point de contact cellulaire une structure en forme de coupe dénommée *transmigratory cup*. Ces terminaisons endothéliales, visibles en microscopie confocale, ressemblent à des microvillosités et s'avèrent très riches en molécules d'adhérence, en actine et autres constituants du cytosquelette (Carman and Springer, 2004). Elles contribuent à orienter le leucocyte en vue de l'étape de diapédèse. La déstructuration de ces protrusions endothéliales entraîne d'ailleurs l'inhibition du processus de transmigration leucocytaire (Carman and Springer, 2004).

S'opère alors la migration transendothéliale, soit suivant la **voie paracellulaire** ou selon un **mode transcellulaire**.

La voie paracellulaire est la mieux décrite et la plus reconnue. Elle implique une désorganisation transitoire des jonctions serrées et adhérentes pour permettre le passage des leucocytes entre deux cellules endothéliales adjacentes (Carman, 2009). Plusieurs molécules seraient mises en cause dans l'étape de diapédèse. VE-cadhérine/CD144, un constituant majeur des jonctions adhérentes des cellules endothéliales de la BHE, serait temporairement délocalisé et dissocié du complexe jonctionnel lors du passage des leucocytes à travers l'endothélium cérébral (Shaw et al., 2001). Les protéines de jonctions JAM-A, -B et -C étant capables de former des interactions hétérophiliques avec les intégrines leucocytaires LFA-1, VLA-4 et Mac-1 seraient vraisemblablement aussi impliquées dans le processus de transmigration leucocytaire (Weber et al., 2007). Finalement, la contribution des molécules endothéliales PECAM-1/CD31 et CD99 est souvent évoquée dans l'étape de diapédèse. Le blocage spécifique de PECAM-1/CD31 ou de la protéine glycosylée CD99 au moyen d'anticorps neutralisants inhibe considérablement la migration transendothéliale (Muller et al., 1993; Schenkel et al., 2002). Une étude réalisée en microscopie confocale indique toutefois que CD99 agirait en aval de PECAM-1 dans le processus de transmigration des cellules immunitaires (Lou et al., 2007).

Il est désormais admis que la diapédèse peut également survenir selon un mode transcellulaire, c'est-à-dire qui repose sur le passage des leucocytes au travers des cellules endothéliales. À l'instar de la diapédèse par la voie paracellulaire, la migration transcellulaire est aussi précédée par la formation d'une structure endothéliale en forme de coupe (Carman, 2009). Les mécanismes moléculaires qui entrent en jeu dans ce type de diapédèse sont encore à l'étude mais la contribution de PECAM-1, CD99, JAM-1 et ICAM-1 a été évoquée (Muller, 2011). *In vivo*, l'occurrence du phénomène de migration transcellulaire semble dépendre en grande partie de la localisation et de la nature de l'endothélium à traverser. Au niveau de l'unité neurovasculaire, l'extravasation des leucocytes suivant la voie transcellulaire a été observée et serait sans doute le mode privilégié compte tenu de l'obstacle que peut représenter la présence des jonctions serrées et adhérentes de la BHE (Lyck and Engelhardt, 2012). Plusieurs études font état, dans le modèle de l'EAE, du

passage transcellulaire des leucocytes à travers la BHE tout en préservant l'intégrité des jonctions (Sage and Carman, 2009; Wolburg et al., 2005).

3.2 Le natalizumab

Parmi les approches thérapeutiques de la SEP, celle visant à limiter la migration leucocytaire au sein du SNC et dont il a été fait mention plus tôt dans ce chapitre demeure une des plus efficaces. Il s'agit du natalizumab, un anticorps recombinant humanisé qui se fixe à la sous-unité α_4 des intégrines et inhibe par conséquent l'interaction de l' $\alpha_4\beta_1$ /VLA-4 ou de l' $\alpha_4\beta_7$ /LPAM-1 avec leurs ligands respectifs (Engelhardt and Kappos, 2008). Le natalizumab est prescrit dans les formes actives de SEP de type récurrente-rémittente, en monothérapie de deuxième intention chez les patients qui ne répondent pas aux traitements de première ligne. Il peut aussi être indiqué comme traitement de premier recours chez certains patients rigoureusement sélectionnés qui présentent une forme très agressive de SEP cyclique (Kappos et al., 2011). Le natalizumab entraîne une réduction de 68% du taux annuel de poussées et de 83% de l'apparition de nouvelles lésions observées en imagerie par résonance magnétique, par rapport à un groupe placebo (Polman et al., 2006). Malgré les données probantes sur l'efficacité de ce traitement, le natalizumab s'est vu associé à un risque accru de LEMP, une affection démyélinisante sévère du SNC dont l'évolution peut être fatale et qui est liée à la réactivation du virus JC (Kleinschmidt-DeMasters and Tyler, 2005; Langer-Gould et al., 2005). L'émergence des cas de LEMP chez certains patients traités avec le natalizumab est imputée à une réponse immunitaire déficiente contre le virus JC causée par une immunosuppression quasi-totale du SNC conférée par l'anticorps (Stuve et al., 2007). Une connaissance plus approfondie des mécanismes moléculaires qui régulent la migration des diverses populations de leucocytes à travers l'endothélium de la BHE permettra sans doute d'identifier des cibles thérapeutiques plus précises et envisager une stratégie dont le but sera de restreindre la migration de populations leucocytaires spécifiques à travers la BHE, sans pour autant compromettre l'immunosurveillance locale du SNC (Greenwood et al., 2011). Nous verrons dans le prochain chapitre combien le rôle irréfutable de certains sous-types de lymphocytes T CD4⁺ dans la physiopathologie de l'EAE et de

la SEP en fait des cibles intéressantes pour une intervention pharmacologique éventuelle.

4. Les lymphocytes T_H1 et T_H17 dans la physiopathologie de la sclérose en plaques

Bien que les mécanismes à l'origine du déclenchement de la SEP demeurent en grande partie méconnus, il est généralement admis aujourd'hui que les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle décisif dans l'orchestration de la réponse immunitaire lors de cette affection (McFarland and Martin, 2007). La nature et le profil phénotypique des lymphocytes T effecteurs impliqués dans la SEP ont fait l'objet d'intenses recherches depuis les 20 dernières années. Les enjeux sont à la fois conceptuels et médicaux. L'objectif ultime serait de développer une approche thérapeutique ciblée qui combinerait l'efficacité des immunosuppresseurs au spectre d'action large, tout en évitant les effets indésirables potentiels telles les infections opportunistes qui peuvent survenir en cas d'immunodépression sévère (Menge et al., 2008). L'élaboration de nouvelles thérapies à visée immunomodulatrice et immunosuppressive plus sélective passe par une meilleure caractérisation des sous-populations de leucocytes qui contribuent à l'attaque inflammatoire dans la SEP. Nous consacrerons ce chapitre exclusivement à l'étude de l'activité pathogénique des lymphocytes T effecteurs CD4⁺ dans la SEP et l'EAE. L'emphase sera mise sur les propriétés pro-inflammatoires d'un sous-type de lymphocytes T nouvellement identifiés, les T_H17. Cette population de lymphocytes T auxiliaires a suscité un vif engouement et a fait l'objet de quelques milliers d'articles depuis sa découverte en 2005. L'identification des lymphocytes T_H17 a profondément modifié notre vision des mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent la réponse immunitaire, surtout dans les maladies à caractère auto-immun comme la SEP.

4.1 Le paradigme T_H1/T_H2

En réponse à une stimulation antigénique spécifique, les lymphocytes T CD4⁺ précurseurs naïfs (parfois appelés T_H0) prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs. Les Drs Timothy Mosmann et Robert Coffman proposent en 1986, un modèle de classification des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs en deux voies de différenciation uniques : les T_H1 et T_H2 (Mosmann et al., 1986). Ces deux sous-types de lymphocytes se caractérisent par un profil de cytokines particulier qui leur confère des fonctions effectrices distinctes (Mosmann and Coffman, 1989). Les lymphocytes

T_{H1} produisent essentiellement de l'IFN- γ , mais aussi de l'IL-2, du TNF et dans une moindre mesure la lymphotoxine α (Zhu and Paul, 2008). Ils coordonnent la réponse immune à médiation cellulaire en induisant l'activation des macrophages, et sont donc impliqués de manière prédominante dans l'élimination des virus et autres pathogènes intracellulaires comme la bactérie *Listeria monocytogenes* (Hsieh et al., 1993; Mosmann and Coffman, 1989). Les lymphocytes T_{H2} en revanche, sécrètent principalement de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-13 et de l'IL-25 (Zhu and Paul, 2008). Ils favorisent la réponse immune à médiation humorale en stimulant la commutation isotypique des lymphocytes B vers la synthèse d'IgE. Les lymphocytes T_{H2} interviennent surtout dans le contrôle des infections parasitaires (Mosmann and Coffman, 1989). Sur le plan phénotypique, les lymphocytes T_{H1} et T_{H2} se distinguent aussi par leur expression différentielle des récepteurs de chimiokines. Les effecteurs de type T_{H1} expriment de manière préférentielle les récepteurs de chimiokines CXCR3 et CCR5, tandis que les marqueurs CCR3 et CCR4 sont généralement associés aux lymphocytes T_{H2} (Sallusto et al., 1998).

C'est en grande partie l'environnement cytokinique qui oriente la différenciation des lymphocytes T naïfs vers la voie T_{H1} ou T_{H2}. Ainsi l'IFN- γ et la cytokine IL-12, produite par les cellules présentatrices d'antigène, sont de puissants inducteurs de la polarisation T_{H1}. La liaison de l'IL-12 à son récepteur active la voie de transduction STAT4, qui promeut en retour l'expression du gène de l'*Ifn γ* (Szabo et al., 2003). En se fixant à son récepteur, l'IFN- γ active STAT1. Ce dernier augmente l'expression du facteur de transcription T-bet (*T-box expressed in T cells*), essentiel au développement de la lignée T_{H1}. T-bet induit d'une part l'expression de la chaîne β 2 de l'IL-12R afin de former un récepteur fonctionnel et stimule par ailleurs la production d'IFN- γ , créant par le fait même une boucle de régulation positive de la différenciation T_{H1} (Amsen et al., 2009; Szabo et al., 2003).

Un milieu riche en IL-4 favorisera plutôt la différenciation des lymphocytes T naïfs en T_{H2} via l'expression des facteurs de transcription STAT6 et GATA-3 (*GATA binding protein-3*). GATA-3 active la transcription des gènes codant pour les cytokines caractéristiques de la lignée T_{H2} (Zheng and Flavell, 1997).

Par le biais des cytokines qu'il sécrète, chaque sous-type de lymphocytes T effecteurs est capable de promouvoir son propre développement tout en inhibant la voie de différenciation antagoniste. GATA-3 prévient le développement de la réponse T_H1 en freinant l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur de l'IL-12. T-bet bloque le programme de différenciation T_H2 en régulant négativement le facteur de transcription GATA-3 (Zhu et al., 2010).

Bien entendu, cette dichotomie entre les lymphocytes T_H1 et T_H2 ne représente qu'un concept exagérément simpliste, la catégorisation du profil phénotypique des lymphocytes T effecteurs étant rarement aussi rigide *in vivo* (Zhu and Paul, 2008). Néanmoins, le paradigme T_H1/T_H2 a permis une avancée formidable dans la compréhension des fonctions des lymphocytes T et leur rôle dans la défense contre les organismes pathogènes. Le dogme T_H1/T_H2 a d'ailleurs dominé le monde de l'immunologie pendant plus de 20 ans.

L'équilibre entre les deux sous-populations de lymphocytes T effecteurs permet de générer une réponse immunitaire protectrice appropriée tout en maintenant une homéostasie fonctionnelle. Un dérèglement dans la balance T_H1-T_H2 peut conduire à des pathologies du système immunitaire qui sont liées à une expression préférentielle des cytokines T_H1 ou T_H2 . Ainsi, l'asthme, les allergies et la dermatite atopique résulteraient d'une exacerbation de la réponse T_H2 (Lee and Flavell, 2004). Au contraire, une réponse non contrôlée des lymphocytes T_H1 serait associée à de nombreuses maladies auto-immunitaires incluant la polyarthrite rhumatoïde (Dolhain et al., 1996), le psoriasis (Biedermann et al., 2004), les maladies inflammatoires chroniques intestinales comme la maladie de Crohn, le diabète insulino-dépendant et la SEP (Szabo et al., 2003).

4.2 Implication des lymphocytes T_H1 dans la sclérose en plaques

La SEP a longtemps été considérée comme une maladie induite par les lymphocytes T_H1 . En effet, on dénote au sein des lésions actives du SNC une présence importante de lymphocytes T $CD4^+$ activés et de cytokines pro-inflammatoires propres à une réponse de type T_H1 tels l'IFN- γ , le TNF et l'IL-2 (Lucchinetti et al., 2001; Navikas and Link, 1996). Typiquement, cette production de cytokines est

concentrée au niveau des infiltrats péri-vasculaires. Il n'est pas rare également de mesurer une augmentation du taux de ces mêmes cytokines dans le LCR de patients atteints de la maladie, particulièrement lors d'un épisode de poussée aiguë (Navikas and Link, 1996). On sait par ailleurs que l'administration d'IFN- γ à des patients souffrant de SEP, dans le cadre d'essais thérapeutiques, provoque une augmentation transitoire du nombre de poussées (Panitch et al., 1987). Un autre argument qui plaide en faveur de l'implication des effecteurs T_H1 dans la SEP repose sur l'analyse du profil d'expression des récepteurs de chimiokines présents à la surface des cellules immunitaires qui infiltrent le SNC. On rapporte au sein des lésions actives de SEP, une augmentation de la fréquence des lymphocytes T exprimant les marqueurs CXCR3 et CCR5, qui caractérisent normalement le phénotype T_H1 (Sorensen et al., 1999).

Le modèle d'EAE met également en valeur le rôle fondamental des lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IFN- γ dans l'initiation et la pérennisation de la réponse inflammatoire. Le fait que la maladie puisse être induite passivement à des souris receveuses par le transfert de clones auto-réactifs T_H1, mais pas par les lymphocytes T_H2, est un des arguments les plus éloquents ayant contribué dans le passé à classifier la SEP comme une affection de type T_H1 (Baron et al., 1993; Kuchroo et al., 1995). Conformément à cette hypothèse, les souris invalidées pour le gène *Tbet*, responsable de la polarisation vers la voie T_H1 et de la production d'IFN- γ , ne développent pas d'EAE (Bettelli et al., 2004; Lovett-Racke et al., 2004). Les souris déficientes pour STAT4, le facteur de transcription intervenant en aval du récepteur de l'IL-12, sont aussi résistantes à l'EAE (Chitnis et al., 2001).

4.3 Paradoxes associés avec la dichotomie T_H1–T_H2 dans le modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

Originellement, la fonction effectrice et l'activité délétère des lymphocytes T_H1 dans la physiopathologie de la SEP et de l'EAE ont été attribuées essentiellement à l'IFN- γ , la cytokine qui caractérise ce sous-type de cellules. La présence de taux élevés d'IFN- γ détectés au pic de la maladie dans le SNC de souris atteintes d'EAE, combinée à une réduction de l'expression de cette cytokine lors de la résolution de l'inflammation, conforte cette hypothèse (Merrill, 1992). Curieusement cependant,

l'invalidation du gène de l'IFN- γ ou de son récepteur n'empêche pas l'induction de l'EAE chez les souris et en aggrave même les symptômes (Billiau et al., 1988; Ferber et al., 1996; Krakowski and Owens, 1996; Willenborg et al., 1996). Ces observations laissent entendre que bien que certaines molécules impliquées dans la voie de différenciation des lymphocytes T_{H1} (comme T-bet) occupent un rôle central dans l'orchestration de la réponse immunitaire dans l'EAE, la production d'IFN- γ , en revanche, n'est pas indispensable (Lovett-Racke et al., 2011). Dès lors, l'intérêt fut donc d'établir la contribution de l'IL-12 dans l'induction et la pathologie de l'EAE, puisque cette cytokine est elle aussi essentielle au développement des lymphocytes T_{H1}.

L'IL-12 est produite principalement par les cellules présentatrices d'antigène incluant les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages (Trinchieri, 2003). Il s'agit d'un hétérodimère constitué de l'association de deux sous-unités distinctes, soit une chaîne α (IL-12p35) et une chaîne β (IL-12p40) (Kobayashi et al., 1989). Ces deux sous-unités doivent être transcrites par la même cellule, puisqu'individuellement elles n'ont aucune fonction biologique (Wolf et al., 1991). L'IL-12 est reconnue par un récepteur formé de deux chaînes β . La chaîne IL-12R β 1 du récepteur est impliquée dans la liaison avec la sous-unité p40 de la cytokine. La sous-unité p35 se fixe à la chaîne IL-12R β 2 (Watford et al., 2003). Les chaînes β 1 et β 2 du récepteur de l'IL-12 sont co-exprimées par les lymphocytes T activés, les cellules NK et les cellules dendritiques.

Comme attendu, les souris IL-12p35^{-/-} et IL-12p40^{-/-} sont incapables de générer une réponse de type T_{H1} (Becher et al., 2002). Les études visant à définir le rôle de l'IL-12 dans la pathologie de l'EAE ont cependant conduit à des résultats étonnants. Les souris génétiquement déficientes pour la sous-unité p40 de l'IL-12 se sont avérées être résistantes à l'induction de l'EAE, alors que les souris IL-12p35^{-/-} développent la maladie (Becher et al., 2002). Les conclusions de ces expériences sont difficiles à concilier avec un rôle direct des lymphocytes T_{H1} dans la pathologie de l'EAE. Qui plus est, la découverte d'une nouvelle cytokine apparentée à l'IL-12 a amené à reconsidérer le rôle des effecteurs T_{H1} dans le développement de l'EAE et

a permis de faire la lumière sur les résultats à priori paradoxaux des études réalisées sur les souris déficientes en IL-12.

4.4 La découverte des lymphocytes T_H17

Près d'une dizaine d'années après l'identification de l'IL-12, une nouvelle cytokine hétérodimérique, l'IL-23, est mise en évidence par l'équipe du Dr Kastelein à l'Institut de Recherche de DNAX. L'IL-23 est constituée de la chaîne α IL-23p19, qui présente une forte homologie structurale avec la sous-unité p35 de l'IL-12, et de la chaîne IL-12p40 qu'elle partage avec l'IL-12 (Oppmann et al., 2000). Comme c'est le cas pour la sous-unité p35, la sécrétion efficace de p19 requiert son association avec l'IL-12p40. Les macrophages et les cellules dendritiques produisent et sécrètent l'hétérodimère p19p40 (Croxford et al., 2012; Tato and Cua, 2008).

Suite à la caractérisation de l'IL-23, il est apparu évident que les expériences menées sur les souris p40^{-/-} ne permettaient pas de distinguer l'effet de l'IL-12 de celui de l'IL-23 : les souris invalidées pour l'*Il12p40* étant déficientes pour les deux cytokines à la fois. Les travaux réalisés sur les souris déficientes pour les sous-unités spécifiques p35 et p19 ont toutefois permis de réévaluer les contributions relatives de l'IL-12 et de l'IL-23 au développement de l'EAE. La perte d'IL-12 chez les souris IL-12p35^{-/-} est associée à une exacerbation de l'EAE, tandis que l'absence d'IL-23 chez les souris IL-23p19^{-/-} protège celles-ci de la maladie. Ces observations suggèrent un rôle essentiel de l'IL-23, et non de l'IL-12, dans le développement de l'EAE (Cua et al., 2003).

Les souris p19^{-/-} n'affichent aucune anomalie dans leur réponse T_H1 ou dans leur production d'IFN- γ (Langrish et al., 2005). En 2005, Langrish *et al.* attribuent plutôt à l'IL-23 un rôle clé dans le développement d'une nouvelle sous-population de lymphocytes T CD4⁺ qui sécrètent majoritairement de l'IL-17A et de l'IL-17F. Ces lymphocytes, subséquentement nommés T_H17 en raison de leur capacité à produire de l'IL-17, ont une origine distincte de celle des T_H1 et des T_H2 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). En réponse à une stimulation avec l'IL-23, les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques envers le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ produisent de l'IL-17 et sont capables d'induire l'EAE lorsque transférés à des animaux syngéniques (Langrish

et al., 2005). Outre la production d'IL-17, l'IL-23 induit également la sécrétion d'IL-22 (Liang et al., 2006), d'IL-26 (Wilson et al., 2007) et de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011) par les lymphocytes T_H17. D'après l'équipe du Dr Kuchroo, les lymphocytes T_H17 seraient également caractérisés par leur production d'IL-21 (Korn et al., 2007).

Il est intéressant de noter par ailleurs que seuls les lymphocytes T de type mémoire, et non les naïfs, expriment le récepteur de l'IL-23 (Parham et al., 2002). Celui-ci est formé de la chaîne β 1 du récepteur de l'IL-12 et d'une chaîne spécifique nommée IL-23R. Hormis les lymphocytes T mémoires activés, les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques expriment aussi le récepteur de l'IL-23. L'absence du récepteur de l'IL-23 à la surface des lymphocytes T naïfs suggère l'intervention de facteurs additionnels dans le contrôle de la différenciation des T_H0 en T_H17.

4.5 La différenciation des lymphocytes T_H17

L'étude des éléments requis à la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en T_H17 représente un champ de recherche très actif depuis la découverte de ces cellules en 2005. Le développement et l'expansion des lymphocytes T producteurs d'IL-17 se sont rapidement révélés être indépendants des voies de signalisation qui caractérisent les lignées T_H1 et T_H2 (Harrington et al., 2005). Néanmoins, il subsiste encore aujourd'hui des différences apparentes quant aux molécules essentielles au programme de différenciation des lymphocytes T_H17 murins et humains (Ghoreschi et al., 2011).

Contrôle des mécanismes de différenciation des lymphocytes T_H17 chez la souris

En 2006, trois études menées de front démontrent que la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs murins vers un phénotype T_H17 dépend de l'action combinée du TGF- β et de l'IL-6, deux cytokines reconnues de prime abord pour leurs effets antagonistes (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Le TGF- β est une cytokine aux propriétés immuno-régulatrices qui induit l'expression de Foxp3 (*forkhead box P3*), le facteur de transcription responsable de la conversion des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs (Tregs) (Li and

Flavell, 2008). En présence d'IL-6 cependant, le TGF- β active simultanément l'expression de ROR α et de ROR γ t (*retinoic-acid-receptor-related orphan receptor- γ thymus*), ce dernier étant identifié comme le facteur de transcription clé qui dirige la différenciation des lymphocytes T_H17 (Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2008b). En absence d'IL-6, Foxp3 inhibe directement ROR γ t, bloquant par le fait même la voie de différenciation des lymphocytes T_H17. La présence d'IL-6 au contraire prévient la transcription du gène *Foxp3*, ce qui empêche le développement des Tregs. La genèse des lymphocytes Tregs et T_H17 semble donc intimement liée, l'IL-6 représentant un facteur décisif dans l'orientation du programme de différenciation vers une voie ou vers l'autre (Bettelli et al., 2006). Dans le modèle animal d'EAE, les souris invalidées pour le gène *Il6* résistent au développement de la maladie et présentent un nombre réduit de lymphocytes T produisant de l'IL-17 (Korn et al., 2007).

L'expression de ROR γ t conduit à la transcription de gènes typiquement associés au phénotype T_H17, incluant ceux codant pour les cytokines IL-17, IL-22 et IL-21 (Yang et al., 2008b). Korn *et al.* proposent que l'IL-21 puisse agir de façon autocrine en amplifiant la fréquence des précurseurs T_H17 (Korn et al., 2009). Ainsi, l'IL-21 créerait une boucle de rétroaction positive qui favoriserait le développement des lymphocytes T_H17, de manière analogue à l'effet qu'exercent l'IFN- γ ou l'IL-4 sur les lymphocytes T_H1 et T_H2 respectivement. Par ailleurs, ROR γ t stimule également l'expression du récepteur de l'IL-23. L'IL-23 jouerait alors un rôle dans la phase finale de différenciation des lymphocytes T_H17 en assurant la survie et le maintien du phénotype T_H17 et en stimulant de nouveau la production d'IL-17 et d'IL-22 (Buonocore et al., 2010; McGeachy et al., 2009).

D'autres signaux interviennent également dans la différenciation des effecteurs T_H17. On rapporte notamment que l'IL-6 et l'IL-23 activent la voie de signalisation STAT3. Les souris STAT3 knock-out affichent d'ailleurs un déficit au niveau de la fréquence des lymphocytes producteurs d'IL-17 (Harris et al., 2007). Les autres facteurs qui régulent la différenciation des lymphocytes T_H17 incluent BATF (*basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*) (Schraml et al., 2009), IRF4 (*interferon regulatory factor-4*) (Brustle et al., 2007), RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*)

(Zhang et al., 2008), le récepteur aux hydrocarbures aromatiques ou Ahr (de l'anglais *aryl hydrocarbon receptor*) (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008) de même que la cytokine IL-1 (Chung et al., 2009).

La différenciation des lymphocytes T_H17 chez l'homme

La différenciation des lymphocytes T_H17 chez l'homme soulève beaucoup plus de controverse que celle décrite dans le système murin. Initialement, il fut démontré que le phénotype T_H17 des lymphocytes humains ne s'acquerrait pas au moyen de la combinaison du TGF- β et de l'IL-6, mais plutôt sous l'action conjointe de l'IL-6 et l'IL-1 β (Acosta-Rodriguez et al., 2007) ou celle de l'IL-23 et l'IL-1 β (Wilson et al., 2007). Ces cytokines permettraient l'expression d'IL-17 et du facteur de transcription RORC, l'orthologue de ROR γ t chez l'humain. Ces deux études s'accordaient également pour dire que le TGF- β était non seulement superflu mais qu'il inhibait le développement des lymphocytes T_H17 humains. Une des critiques majeures émises à l'encontre de ces travaux concerne le caractère dit « naïf » des lymphocytes T_H0 utilisés comme population de départ (O'Garra et al., 2008). Plus récemment, trois groupes de recherche indépendants ont donc choisi d'utiliser des lymphocytes T humains naïfs purifiés à partir du sang de cordon ombilical afin de montrer que le TGF- β est essentiel à la différenciation des lymphocytes T_H17 humains au même titre que chez la souris (Manel et al., 2008; Volpe et al., 2008; Yang et al., 2008a). Chacune de ces études combine des cytokines différentes en association avec le TGF- β , mais toutes concluent en faveur de l'importance de ce facteur dans la différenciation des lymphocytes T_H17 humains. Toutefois, le consensus n'est toujours pas de mise en ce qui a trait à l'importance du TGF- β , et ce même chez la souris. L'équipe du Dr O'Shea démontre en utilisant diverses approches pharmacologiques (y compris des anticorps qui bloquent la voie de signalisation du TGF- β), que la combinaison de l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-23 suffit à induire la production d'IL-17 par les lymphocytes CD4⁺ naïfs de manière TGF- β 1-indépendante (Ghoreschi et al., 2010).

Les cytokines évoquées comme ayant un effet inhibiteur sur la différenciation des T_H17 comprennent l'IL-4, l'IFN- γ (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005), l'IL-2 (Laurence et al., 2007), l'IL-25 (Kleinschek et al., 2007) et l'IL-27 (Stumhofer et al.,

2006). L'IL-27 empêche le développement des lymphocytes T_H17 en induisant la production d'IL-10, une cytokine aux propriétés immuno-régulatrices (Awasthi et al., 2007). L'IL-27 exerce également un effet régulateur indirect sur les lymphocytes T_H17 en augmentant la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes $CD4^+$ naïfs, favorisant par le fait même un phénotype T_H1 . *In vivo*, l'IL-27 inhibe l'inflammation causée par les T_H17 dans le SNC en EAE (Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006).

4.6 Propriétés physiologiques et inflammatoires des lymphocytes T_H17

Les fonctions exactes des lymphocytes T_H17 dans l'immunité infectieuse ne sont pas encore entièrement élucidées. Depuis leur reconnaissance en tant que lignée à part entière, on leur a surtout attribué un rôle dans la protection contre les pathogènes qui ne sont pas pris en charge par les effecteurs T_H1 et T_H2 , soit les bactéries extracellulaires et les mycoses (Gaffen, 2011). La fonction effectrice des lymphocytes T_H17 est assurée principalement par les cytokines qu'ils sécrètent, l'IL-17 étant la mieux caractérisée à ce jour.

L'IL-17

Les cytokines de la famille de l'IL-17 sont au nombre de 6 : IL-17 (ou IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (ou IL-25) et IL-17F (Iwakura et al., 2011). L'IL-17A, qui est la cytokine prototypique, partage la plus forte homologie de séquence avec l'IL-17F. Toutes deux possèdent des activités biologiques distinctes mais qui se chevauchent et sont en grande partie pro-inflammatoires. Ce sont les seules cytokines de cette famille à être sécrétées par les lymphocytes T_H17 (Langrish et al., 2005). On rapporte également que les lymphocytes de type $\gamma\delta$, NK, NKT, $CD8^+$ et les neutrophiles produisent de l'IL-17A. L'IL-17A et l'IL-17F se lient au même récepteur, formé du complexe IL-17RA et IL-17RC. L'IL-17RA est exprimé de façon relativement ubiquitaire, surtout au niveau des cellules hématopoïétiques mais également sur les cellules endothéliales et épithéliales. Au contraire, l'IL-17RC n'est que faiblement exprimé par les cellules immunitaires. L'IL-17 induit chez la cellule cible la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF, IL-1 β , IL-6, GM-CSF) et l'expression de chimiokines (CXCL1, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MCP-3/CCL7), ce

qui entraîne notamment le recrutement de neutrophiles et de macrophages (Iwakura et al., 2011).

La cytokine IL-17E (ou IL-25) quant à elle est associée à une réponse de type T_H2 et est produite entre autres par les lymphocytes T, les mastocytes et les cellules épithéliales intestinales. Elle est responsable du recrutement des polynucléaires éosinophiles (Gaffen, 2009). Finalement, peu de données sont disponibles dans la littérature quant à la fonction des cytokines IL-17B–D et sur les cellules qui les produisent.

L'IL-22

L'IL-22 est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-10 qui est produite par les lymphocytes T_H17 en réponse à une stimulation avec l'IL-23. Le TGF- β apparaît plutôt comme un inhibiteur de l'IL-22 (Volpe et al., 2009). L'IL-22 est également sécrétée par les lymphocytes mémoires polarisés vers la voie T_H1 et par les cellules NK (Sonnenberg et al., 2011). Contrairement à l'IL-17, son récepteur n'est pas exprimé par les cellules hématopoïétiques, mais par les cellules épithéliales de la peau, du foie, des poumons, et du colon (Wolk et al., 2004). Le récepteur de l'IL-22 est un hétérodimère constitué de la chaîne IL-22R1 et de la chaîne IL-10R2 qui fait aussi partie du complexe fonctionnel du récepteur de l'IL-10 (Kotenko et al., 2001). Il existe en plus un récepteur soluble de l'IL-22, appelé IL-22BP (IL-22 *binding protein*), qui contrecarre la signalisation de l'IL-22 via le récepteur hétérodimérique (Dumoutier et al., 2001).

La liaison de l'IL-22 sur son récepteur active la voie de signalisation STAT3. Le caractère anti- ou pro-inflammatoire de l'IL-22 semble varier en fonction du tissu et des cytokines présentes dans le milieu. Par exemple, on lui connaît une fonction protectrice au sein des épithéliums du foie et du colon. Par contre, l'IL-22 exacerbe la réponse inflammatoire dans le psoriasis. L'IL-22 serait également essentielle dans les mécanismes de défense contre l'infection pulmonaire à *Klebsiella pneumoniae* et contre la bactérie entérique *Citrobacter rodentium* (Sonnenberg et al., 2011).

L'IL-26

L'IL-26 est un autre membre de la famille de l'IL-10. L'IL-26 partage la chaîne commune du récepteur IL-10R2 avec l'IL-22 et l'IL-10. La sous-unité α du récepteur de l'IL-26 est l'IL-20R1 (Sheikh et al., 2004). Le rôle de l'IL-26 secrétée par les lymphocytes T_H17 humains reste peu étudié en raison de l'absence d'expression endogène de cette cytokine chez les rongeurs (Donnelly et al., 2010). Néanmoins, une augmentation de l'expression de l'IL-26 est notée au cours de l'inflammation des muqueuses du colon dans la maladie de Crohn (Dambacher et al., 2009). L'IL-26 induit l'activation de STAT1 et STAT3 et stimule la production d'IL-8 dans des lignées cellulaires dérivées du colon (Donnelly et al., 2010). L'IL-26 est également impliquée dans la polyarthrite rhumatoïde. En effet, on rapporte des taux élevés de la cytokine dans le liquide synovial prélevé au niveau des articulations de patients atteints de la maladie (Corvaisier et al., 2012).

Rôle des lymphocytes T_H17 dans le contrôle des infections bactériennes et fongiques

Les lymphocytes T_H17 sont impliqués dans la défense de l'hôte contre les mycoses et certaines bactéries extracellulaires, particulièrement celles qui colonisent la peau, les muqueuses de l'intestin et les voies aériennes (Onishi and Gaffen, 2010). Ce rôle est illustré chez les sujets porteurs d'une mutation au niveau du gène *Stat3* et souffrant du syndrome de Job (syndrome d'hyper IgE, HIES) (McDonald, 2012). On présume qu'un déficit spécifique de la réponse T_H17 chez ces individus les prédispose aux candidoses et aux infections cutanées récidivantes aux staphylocoques. Plusieurs travaux rapportent aussi une plus haute susceptibilité aux infections à *Candida albicans* et *Klebsiella pneumonia* chez les souris déficientes en IL-17 et en IL-17RA (Louten et al., 2009). Le taux de mortalité accru chez ces animaux serait attribuable à un défaut dans le recrutement des neutrophiles au site de l'infection. Les souris *knock-out* pour l'IL-17RA développent également une infection spontanée au *Staphylococcus aureus* autour des yeux et des narines (Miossec and Kolls, 2012).

Implication des lymphocytes T_H17 dans les maladies à caractère auto-immun

En plus de son rôle bénéfique dans l'établissement d'une réponse immune efficace contre certaines infections, la voie T_H17 occupe une fonction primordiale dans le développement de plusieurs pathologies auto-immunes inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde. Cette affection chronique est caractérisée par une infiltration des articulations synoviales par les cellules inflammatoires, qui évolue éventuellement vers la destruction progressive du cartilage et de l'os. Des taux importants d'IL-17 sont détectés dans le liquide synovial chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (Kotake et al., 1999). Dans le modèle murin d'arthrite induite au collagène, les souris invalidées pour le gène de l'IL-17 ne développent pas la maladie (Nakae et al., 2003). De même, l'injection d'un anticorps neutralisant dirigé contre la cytokine IL-17 ou le récepteur IL-17RA diminue l'intensité de l'atteinte articulaire dans le modèle animal d'arthrite induite au collagène (Lubberts et al., 2004). Au contraire, l'expression ectopique d'IL-17 par thérapie génique exacerbe la maladie chez les animaux (Lubberts et al., 2002).

Comme pour la polyarthrite rhumatoïde, de nombreux arguments incriminent les lymphocytes T_H17 dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. La fréquence élevée des lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-17 décelés dans le sérum et dans les muqueuses intestinales des patients atteints de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique plaide en faveur de cette hypothèse (Fujino et al., 2003). Dans le modèle murin de colite expérimentale, les anticorps dirigés contre l'IL-17 diminuent l'inflammation intestinale. De plus, les souris déficientes pour la sous-unité p19 de l'IL-23 résistent à l'induction de la maladie (Yen et al., 2006). Par ailleurs, des études génétiques rapportent qu'un polymorphisme du gène codant pour le récepteur de l'IL-23 conférerait une plus grande susceptibilité de développer la maladie de Crohn (Duerr et al., 2006; Fisher et al., 2008). Finalement, des essais cliniques visant à neutraliser l'IL-23 à l'aide d'anticorps monoclonaux (anti-IL-12/23p40) se sont révélés prometteurs dans le traitement de la maladie de Crohn (Feagan et al., 2016; Sandborn et al., 2008; Sandborn et al., 2012).

Une réévaluation de plusieurs maladies considérées dans le passé comme étant induites uniquement par les lymphocytes T_H1 ou même par les T_H2 révèle en fait une composante T_H17 plus ou moins certaine. C'est le cas du psoriasis, du lupus

érythémateux disséminé, de l'asthme (Miossec and Kolls, 2012) et de la SEP, dont il sera question dans la section suivante.

4.7 Contribution relative des lymphocytes T_H17 dans la physiopathologie de la sclérose en plaques et de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

Depuis longtemps la SEP est considérée comme une maladie contrôlée essentiellement par les lymphocytes T CD4⁺. À l'origine, le modèle animal d'EAE a surtout mis en valeur le rôle fondamental des lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IFN- γ dans l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire. Cependant, la découverte des lymphocytes T_H17 a remis en cause la contribution exclusive d'un sous-type de lymphocytes T dans la physiopathologie de l'EAE pour souligner plutôt l'extrême diversité des réponses T CD4⁺ effectrices impliquées dans la maladie.

Rôle pro-inflammatoire de l'axe IL-17/IL-23 dans le développement de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

L'engouement initial généré par la découverte des lymphocytes T_H17 a incité les chercheurs, dans un premier temps, à réfuter le rôle délétère accordé aux effecteurs T_H1 dans la pathologie de l'EAE, au profit de celui des T_H17. Ces derniers ont alors été redéfinis comme la principale sous-population de lymphocytes T CD4⁺ responsable des lésions tissulaires dans l'EAE. Plusieurs arguments confirment le bien-fondé de cette hypothèse. Par exemple, Langrish *et al.* démontrent dans un modèle de transfert adoptif, que les lymphocytes T spécifiques envers le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ et stimulés avec l'IL-23 produisent de l'IL-17 et induisent l'EAE. En revanche, ils attestent que les lymphocytes T CD4⁺ générés en présence d'IL-12 sont incapables de transférer la maladie à des animaux syngéniques (Langrish et al., 2005). Subséquemment, le Dr Cua et son équipe démontrent que la neutralisation de l'IL-23 empêche le déclenchement de l'EAE (Chen et al., 2006). Ils constatent par ailleurs que la gravité des symptômes cliniques d'EAE est considérablement réduite suite à l'injection d'un anticorps neutralisant l'IL-17, bien que ce traitement n'éradique pas complètement la maladie chez ces souris. Par contre, l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'IFN- γ exacerbe les signes cliniques d'EAE (Langrish et al., 2005).

Les travaux pionniers du Dr Cua et le développement des connaissances sur les mécanismes qui gouvernent la différenciation des lymphocytes T_H17 inspirent alors un nouveau courant de recherches visant à confirmer le rôle pivot de l'axe inflammatoire IL-23/IL-17 dans la physiopathologie de l'EAE. Komiyama et collègues démontrent que la maladie est fortement atténuée chez les souris invalidées pour le gène *Il17* (Komiyama et al., 2006). Qui plus est, divers facteurs évoqués dans le processus de différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en lymphocytes T_H17 s'avèrent essentiels au développement de l'EAE. C'est le cas notamment de STAT3, ROR γ t, l'IL-6 et l'IL-23 (Harris et al., 2007; Ivanov et al., 2006; Korn et al., 2007; Langrish et al., 2005).

Contribution de l'IL-17 dans la physiopathologie de la sclérose en plaques

Avant même l'identification de la lignée T_H17 , de nombreuses données descriptives chez l'humain laissaient déjà entrevoir un rôle probable des cellules productrices d'IL-17 dans la physiopathologie de la SEP. Dans une publication datant de 1999, on rapporte l'augmentation du nombre de copies d'ARNm (acide ribonucléique messenger) codant pour l'IL-17 dans le sang et le LCR de patients atteints de SEP, particulièrement au moment des poussées aiguës de la maladie (Matusevicius et al., 1999). Quelques années plus tard, un groupe de chercheurs japonais effectue une analyse exhaustive des cytokines détectées dans le LCR de patients atteints de neuromyéélite optique, longtemps considérée comme une forme particulière de SEP caractérisée par une atteinte sévère de la moelle épinière et du nerf optique. Leurs résultats font état d'une hausse des niveaux d'expression de l'IL-17 dans le LCR de patients atteints de neuromyéélite optique par rapport à ceux présentant une SEP « conventionnelle » ou aux sujets contrôles (Ishizu et al., 2005). L'essor fulgurant de la technologie des puces à ADN permettra éventuellement de confirmer l'expression d'IL-17 au niveau des lésions de SEP (Lock et al., 2002). Finalement, une analyse histologique de coupes de cerveaux prélevés en post-mortem sur des patients atteints de SEP révèle un enrichissement de la population de cellules $CD4^+$ IL-17 $^+$ au sein des lésions actives de SEP. Tzartos *et al.* notent de surcroît la présence de lymphocytes T $CD8^+$ exprimant l'IL-17 au niveau des plaques actives (Tzartos et al., 2008).

Contribution des cytokines de la voie T_H17 dans l'induction de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

L'identification des lymphocytes T_H17 a certes bouleversé le schéma classique préétabli de la réponse immunitaire impliquée dans l'EAE et la SEP. Néanmoins, plusieurs études amènent à contester le rôle absolu des cytokines effectrices qui caractérisent le phénotype T_H17 dans l'induction de la maladie. En effet, la neutralisation de l'IL-17A chez les souris invalidées pour le gène de l'IL-17F (bloquant de ce fait deux cytokines de la voie T_H17) n'entraîne qu'un effet bénéfique modeste sur l'évolution de l'EAE (Haak et al., 2009). De la même manière, l'IL-22 n'apparaît pas indispensable au développement de la maladie, comme en témoignent les études sur les souris IL-22^{-/-} (Kreymborg et al., 2007). Au contraire, il est clairement établi que la présence d'IL-23 est requise pour l'induction de l'EAE (Langrish et al., 2005). En fait, l'IL-23 semble être un facteur décisif dans l'initiation et l'amplification de la réaction inflammatoire locale au sein du SNC (McGeachy et al., 2007). Les souris auxquelles on injecte des lymphocytes stimulés *in vitro* avec du TGF- β et de l'IL-6, mais sans IL-23, ne parviennent pas à recruter efficacement les cellules immunes actives dans le SNC, ce qui les rendrait par ailleurs résistantes à l'induction de l'EAE. La stimulation avec le TGF- β favoriserait également la production d'IL-10 par les lymphocytes T_H17 eux-mêmes, ce qui pourrait contribuer à réduire leurs propriétés encéphalogéniques. L'IL-23 conférerait donc une activité pathogène aux lymphocytes T_H17 qui ne serait pas attribuable aux fonctions effectrices de l'IL-17 ou de l'IL-22. Le GM-CSF a été identifié comme un facteur produit par les lymphocytes T en réponse à une stimulation par l'IL-23, et qui contribuerait de manière importante au caractère pathogène des lymphocytes T CD4⁺ (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011). Les souris *knock-out* pour le gène *Gmcsf* sont d'ailleurs complètement protégées de l'EAE (McQualter et al., 2001).

Contribution des lymphocytes T_H1 et T_H17 dans la physiopathologie de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

Il apparaît de plus en plus évident que les lymphocytes T_H17 et les T_H1 sont tous deux impliqués à titre individuel dans l'évolution de l'EAE. En faveur de cette hypothèse, Kroenke *et al.* ont montré que l'injection de lymphocytes T polarisés au moyen de l'IL-12 ou de l'IL-23 induisent l'EAE mais que les signes cliniques et la

pathologie différent dans les deux modèles. Les infiltrats associés avec le transfert de lymphocytes T_H1 sont composés principalement de macrophages et de lymphocytes T et se concentrent surtout au niveau des méninges. L'injection de lymphocytes T_H17 provoque plutôt des lésions cérébrales caractérisées par une infiltration massive de neutrophiles (Kroenke et al., 2008). Stromnes *et al.* confirment, en utilisant une souche de souris différente, que l'injection de lymphocytes T $CD4^+$ préalablement stimulés avec l'IL-23 engendre la formation de lésions inflammatoires disséminées au niveau du parenchyme cérébral. La composition de ces infiltrats se distingue par la présence importante de neutrophiles. Il est à noter que ces souris développent une forme atypique d'EAE (Stromnes et al., 2008). Reste à déterminer si un parallèle peut être établi avec la maladie humaine, dans laquelle les infiltrats sont composés en grande partie de lymphocytes T et de macrophages.

Si les deux sous-types de lymphocytes T effecteurs peuvent mener à la formation de lésions démyélinisantes, certains ont suggéré un rôle dominant des lymphocytes T_H1 dans l'initiation de la maladie. L'hypothèse émise initialement voulait que les lymphocytes T_H1 infiltrent le SNC et créent un environnement favorable à l'entrée subséquente des T_H17 (O'Connor et al., 2008). Toutefois, d'autres proposent le contraire, à savoir que les T_H17 accèdent au SNC en premier (Reboldi et al., 2009). Reboldi *et al.* proposent que les lymphocytes T_H17 utilisent les plexus choroïdes comme port d'entrée dans le SNC, via l'interaction entre le récepteur de chimiokines CCR6 et le CCL20. Le marqueur CCR6 serait exprimé de manière spécifique à la surface des lymphocytes T_H17 , mais pas sur les T_H1 ni les T_H2 .

4.8 Autres acteurs impliqués dans l'axe IL-17/IL-23

Les lymphocytes $T\gamma\delta$

L'IL-17 n'est pas exclusivement produite par les T_H17 et les lymphocytes T cytotoxiques 17 (T_c17 , $CD3^+ CD8^+ IL-17^+$). Les lymphocytes $T\gamma\delta$ ont eux aussi été identifiés comme source majeure d'IL-17 dans divers modèles murins d'infections et de maladies auto-immunitaires (Blink et al., 2014; Martin et al., 2009; Roark et al., 2008). Les $T\gamma\delta$ ne représentent qu'une petite fraction (environ 1 à 5%) des lymphocytes T circulants, mais sont abondants dans l'épithélium des muqueuses de

l'intestin, où ils peuvent constituer jusqu'à 50% de la population totale de lymphocytes T (Carding and Egan, 2002; Girardi, 2006). Les $T\gamma\delta$ possèdent un récepteur formé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ , qui se distingue donc du TCR des lymphocytes T conventionnels constitué des chaînes α et β . Contrairement aux cellules $T\alpha\beta$ conventionnelles, les $T\gamma\delta$ reconnaissent les antigènes sous leur forme native, sans que ceux-ci ne leur soient présentés par les molécules du CMH (Chien and Konigshofer, 2007; Konigshofer and Chien, 2006). Les $T\gamma\delta$ peuvent initier une réponse immunitaire rapide sans même requérir de pré exposition avec leur antigène et présentent ainsi des caractéristiques des cellules de l'immunité innée. Suite à une stimulation avec l'IL-1 β et l'IL-23, les $T\gamma\delta$ sécrètent de l'IL-17, de l'IL-21 et du GM-CSF, avec ou sans engagement de leur TCR (Lukens et al., 2012; Sutton et al., 2009). Cette activation rapide suggère un rôle précoce des $T\gamma\delta$ dans l'inflammation tissulaire, y compris dans l'EAE où il a été établi que les $T\gamma\delta$ favoriseraient l'induction des T_H17 et amplifieraient leurs fonctions effectrices (Sutton et al., 2009). Les $T\gamma\delta$ pourraient également agir en inhibant la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs (Petermann et al., 2010). On sait depuis longtemps que les $T\gamma\delta$ peuvent se retrouver dans les lésions de SEP (Hvas et al., 1993; Wucherpfennig et al., 1992). L'équipe du Dr Thomas Korn rapporte en 2013, la présence de lymphocytes $T\gamma\delta$ porteurs des marqueurs CD161 et CCR6 et produisant de l'IL-17 dans le LCR de patients atteints de SEP (Schirmer et al., 2013).

Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ou ILCs de l'anglais *innate lymphoid cells*) constituent une population de cellules hétérogène dérivant d'un progéniteur commun, qui donne aussi naissance aux lymphocytes B et T. Elles se distinguent de ces derniers par l'absence de récepteur spécifique aux antigènes, faisant d'elles des effecteurs de la réponse innée (Vivier et al., 2018). Elles présentent toutefois certaines similitudes avec les lymphocytes T, notamment en ce qui a trait aux cytokines qu'elles produisent et aux facteurs de transcription qui régissent leur différenciation. Les ILC1 sécrètent de l'IFN- γ et expriment le facteur de transcription T-bet, s'apparentant ainsi aux T_H1 . Les ILC2 dépendent de GATA-3 pour produire de l'IL-5 et de l'IL-13. Elles représentent l'équivalent inné des T_H2 . Finalement, à

l'instar des T_H17 (leur contrepartie du système adaptatif), les ILC3 répondent à l'IL-1 β et l'IL-23, expriment le facteur de transcription ROR γ t et sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22 (Spits et al., 2013; Spits and Di Santo, 2011). À l'état physiologique, les ILCs sont principalement localisées au niveau des muqueuses de l'intestin et des poumons où elles exerceraient un rôle clé dans la protection des barrières épithéliales contre les infections bactériennes. Des ILC3 ont été détectées au niveau des méninges chez les souris EAE (Hatfield and Brown, 2015). Cependant leur contribution exacte à la physiopathologie de la SEP et de l'EAE reste encore à démontrer. En effet, l'ablation complète des ILCs ne contribuerait pas de manière significative à la progression de la maladie et n'affecterait pas l'incidence de l'EAE (Mair and Becher, 2014).

4.9 Les lymphocytes T_H17 comme cible thérapeutique

Les données prometteuses provenant des études dans les modèles animaux expérimentaux ont ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement des maladies inflammatoires qui sont sous le contrôle de l'axe IL-23/ T_H17 comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la maladie de Crohn et la SEP. Des anticorps dirigés contre diverses molécules impliquées au niveau des fonctions effectrices ou dans la différenciation des lymphocytes T_H17 sont en cours de développement ou font déjà l'objet d'essais cliniques. C'est le cas notamment de l'ustekinumab (CNTO 1275, développé par Centocor), un anticorps monoclonal humain spécifique de la sous-unité p40 commune aux cytokines IL-12 et IL-23. Cet anticorps a fait preuve d'une efficacité remarquable dans le traitement des formes modérées à sévères de psoriasis en plaques au cours d'essais cliniques de phase III (Leonardi et al., 2008; Papp et al., 2008). Ces études rapportent toutefois une plus grande susceptibilité des sujets traités aux infections. L'ustekinumab a également été approuvé en 2016 dans la prise en charge de la maladie de Crohn, particulièrement chez les patients réfractaires aux inhibiteurs du TNF (Feagan et al., 2016; Sandborn et al., 2008; Sandborn et al., 2012). Des essais cliniques supplémentaires sont en cours pour évaluer l'efficacité de l'ustekinumab dans le traitement de la colite ulcéreuse. Quoique bien toléré, l'ustekinumab n'induit pas de réduction significative du nombre de lésions rehaussées par le gadolinium chez les

patients atteints de la forme cyclique de SEP (Segal et al., 2008). Plusieurs hypothèses ont été évoquées afin d'expliquer l'échec d'une telle approche thérapeutique chez l'humain et la discordance avec les résultats probants obtenus dans le modèle animal d'EAE. D'une part, on présume que l'IL-12 et l'IL-23 joueraient un rôle décisif à un stade précoce du développement de la SEP. L'effet thérapeutique d'une molécule comme l'ustekinumab serait escompté au tout début de l'évolution de la maladie, et non pas une fois celle-ci bien établie comme chez les patients sélectionnés dans l'étude de Segal *et al.* (Longbrake and Racke, 2009). Dans les études précliniques effectuées sur les modèles expérimentaux, l'anti-IL-12/IL-23p40 fut systématiquement injecté peu avant ou dès l'apparition des premiers symptômes cliniques d'EAE (Brok et al., 2002; Ichikawa et al., 2000). Un autre point important à considérer est la faible biodisponibilité cérébrale de l'ustekinumab, que l'on croit incapable de franchir la BHE intacte.

Plus récemment, plusieurs anticorps dirigés contre la sous-unité p19 de l'IL-23 ont été développés, permettant de cibler spécifiquement la cytokine IL-23 en s'affranchissant de possibles effets de réaction croisée avec l'IL-12. Le tildrakizumab, le guselkumab et le risankizumab viennent d'être approuvés pour le traitement des formes modérées à sévères de psoriasis (Blauvelt et al., 2017; Gordon et al., 2018). Étonnamment, les patients atteints de psoriasis qui répondaient de manière inadéquate à l'ustekinumab ont vu une nette amélioration de leurs symptômes lorsque leur traitement a été remplacé par le guselkumab ou par rapport aux patients ayant poursuivi leur traitement initial (Langley et al., 2018). Le guselkumab, le risankizumab, le brazikumab et le mirikizumab font quant à eux l'objet d'essais cliniques en phase II ou III pour le traitement des formes modérées et sévères de la maladie de Crohn (Feagan et al., 2017; Sands et al., 2017).

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, les modèles animaux expérimentaux permettent d'appréhender un rôle important de l'IL-17A et de l'IL-17F dans diverses maladies inflammatoires chroniques, ce qui justifie le développement d'agents thérapeutiques ciblant ces cytokines. Actuellement, deux anticorps humanisés dirigés spécifiquement contre l'IL-17 et qui neutralisent aussi l'hétérodimère IL-17A/IL-17F ont été testés. Le secukinumab (AIN457, développé par Novartis) a été approuvé et est indiqué dans le traitement du psoriasis, de

l'arthrite psoriasique et de la spondylarthrite ankylosante (Baeten et al., 2015; Bissonnette et al., 2017; McInnes et al., 2015) et fait l'objet d'essais cliniques dans le traitement des uvéites (Letko et al., 2015). Le secukinumab réduit également le nombre de nouvelles lésions inflammatoires décelées en imagerie par résonance magnétique chez les personnes atteintes de la forme récurrente-rémittente de SEP (Havrdova et al., 2016). L'ixekizumab (LY2439821, développé par Eli Lilly) est maintenant lui aussi approuvé pour le traitement du psoriasis (Gordon et al., 2016) et est à l'étude dans l'arthrite psoriasique (van der Heijde et al., 2018). Le secukinumab et l'ixekizumab ont mené à l'amélioration des symptômes et paramètres pro-inflammatoires telle la protéine C réactive chez les patients arthritiques sans causer d'effets indésirables notables (Genovese et al., 2010; Hueber et al., 2010). Finalement, le brodalumab (AMG827, développé par Amgen), un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le récepteur de l'IL-17, a lui aussi été approuvé dans le traitement du psoriasis (Papp et al., 2016).

Les facteurs de transcription RORC, STAT3 et les cytokines IL-1 et IL-6 sont également envisagés comme cibles thérapeutiques potentielles, surtout en raison des résultats très prometteurs obtenus chez la souris au moyen d'inhibiteurs spécifiques de ces molécules. En particulier, le tocilizumab, un anticorps monoclonal humanisé qui bloque l'action du récepteur de l'IL-6 et qui est déjà utilisé en Europe dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, s'est révélé être efficace dans les formes réfractaires de neuromyéélite optique (Araki et al., 2014; Smolen et al., 2008). Cependant, la vigilance reste de mise en ce qui concerne l'utilité des modèles animaux comme facteurs prédictifs des traitements de la SEP. Il importe aussi de tenir compte des relations complexes et de la contribution relative de la voie T_H1 et T_H17 dans la genèse de la maladie.

D'un point de vue thérapeutique, il peut être intéressant de bloquer le processus de transmigration des lymphocytes T_H17 vers le SNC. À ce propos, la Dre Larochelle du laboratoire du Dr Prat a démontré récemment que la molécule MCAM est exprimée sur presque tous les lymphocytes T $CD4^+$ producteurs d'IL-17 et facilite leur recrutement au sein du SNC. La neutralisation de MCAM chez la souris freine de manière significative l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC et retarde le développement des signes cliniques d'EAE (Larochelle et al., 2012).

HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Bon nombre des connaissances acquises sur l'induction et la fonction des lymphocytes T_H17 découlent d'observations faites à partir du modèle d'EAE. À l'instar des lymphocytes T_H1 , le transfert de lymphocytes T $CD4^+$ polarisés au moyen de l'IL-23 vers un profil T_H17 suffit à provoquer l'apparition des signes cliniques d'EAE et à induire la formation de lésions de démyélinisation au sein du SNC (Kroenke et al., 2008; Langrish et al., 2005; Stromnes et al., 2008). Dès lors, les lymphocytes T_H17 s'imposent comme des effecteurs principaux dans la pathologie de l'EAE. Cette hypothèse sera largement étayée par les expériences réalisées sur les souris déficientes pour les gènes de l'IL-23, $ROR\gamma_t$, STAT-3 ou l'IL-6 qui, en plus d'afficher un défaut de leur réponse T_H17 , sont toutes résistantes à l'induction de l'EAE (Korn et al., 2009). Bien que l'ensemble des données chez la souris soit en accord avec un rôle majeur des lymphocytes T_H17 dans le développement de l'EAE, peu d'études s'étaient consacrées à valider leur fonction dans la pathologie humaine. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux présentés dans cette thèse. Mon projet de recherche visait à élucider diverses questions restées sans réponse : 1) le profil cytokinique des lymphocytes T_H17 humains est-il comparable à celui décrit chez la souris ? 2) Est-ce que les lymphocytes T_H17 générés à partir du sang de patients atteints de SEP se distinguent de ceux de sujets contrôles ? 3) Selon quel mécanisme les lymphocytes T_H17 contribuent-ils à l'attaque inflammatoire dans le SNC ? Et de façon plus précise, 4) est-ce que les lymphocytes T_H17 interagissent avec l'endothélium vasculaire cérébral ?

Notre hypothèse de travail suggérait un rôle délétère des lymphocytes T_H17 sur l'endothélium cérébral. Plus précisément, nous supposons que les T_H17 infiltrent le SNC et, de par leur interaction avec les cellules endothéliales de la BHE, engendrent un environnement inflammatoire qui favorise le recrutement d'autres cellules immunitaires au sein du SNC. Ainsi la BHE, sous l'influence des cytokines produites par les T_H17 , contribuerait à l'initiation et la propagation de la réaction inflammatoire qui aboutit ultimement à la formation des lésions de SEP.

Pour étayer cette hypothèse, nous nous étions fixés les objectifs suivants :

- Caractériser les lymphocytes T_H17 chez l'humain.
- Évaluer la capacité des T_H17 à migrer à travers la BHE *in vitro* et *in vivo*.
- Analyser l'effet des cytokines produites par les T_H17 sur les propriétés de la BHE (en portant une attention particulière à la perméabilité de la BHE, à l'expression des protéines de jonctions serrées et des molécules d'adhésion).
- Comparer les lymphocytes T_H17 générés à partir du sang de patients atteints de SEP avec ceux de sujets contrôles, quant à leur production intracellulaire d'IL-17, d'IL-22, d'IFN- γ et leurs marqueurs de surface.

En accord avec les objectifs introduits ci-haut, les résultats seront présentés en deux parties correspondant à deux de mes contributions scientifiques publiées.

ARTICLE I

Titre : Human T_H17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and CNS inflammation.

Journal : Nature Medicine. 2007. Oct ;13(10) :1173-5.

Auteurs : Hania Kebir, Katharina Kreymborg, Igal Ifergan, Aurore Dodelet-Devillers, Romain Cayrol, Monique Bernard, Fabrizio Giuliani, Nathalie Arbour, Burkhard Becher & Alexandre Prat

Contributions : Le Dr Prat et moi-même avons initié le projet, conçu les hypothèses de travail, analysé les résultats et rédigé le manuscrit. J'ai effectué la majeure partie des expériences *in vitro* et mis sur pied le protocole d'expansion des lymphocytes T_H17 humains avec l'aide du Dr Ifergan. Les Drs Kreymborg et Becher ont mis au point et réalisé les expériences sur les animaux. Aurore Dodelet-Devillers et le Dr Cayrol ont fourni les données *in situ*. La Dre Bernard était chargée de la culture primaire des cellules endothéliales humaines. Le Dr Giuliani a effectué les tests de cytotoxicité des lymphocytes T sur les cultures de neurones. La Dre Arbour a participé aux échanges scientifiques.

Brief Communication

Human T_H17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and CNS inflammation

Hania Kebir¹, Katharina Kreymborg², Igal Ifergan¹, Aurore Dodelet-Devillers¹, Romain Cayrol¹, Monique Bernard¹, Fabrizio Giuliani³, Nathalie Arbour¹, Burkhard Becher² & Alexandre Prat¹

¹Neuroimmunology Unit, Center for the Study of Brain Diseases, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal–Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada.

²Neurology Department, Division of Neuroimmunology, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zurich, Switzerland.

³Department of Medicine, Division of Neurology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 2G3, Canada.

Correspondence should be addressed to A.P. (a.prat@umontreal.ca).

T_H17 lymphocytes appear to be essential in the pathogenesis of numerous inflammatory diseases. We demonstrate here the expression of IL-17 and IL-22 receptors on blood-brain barrier endothelial cells (BBB-ECs) in multiple sclerosis lesions, and show that IL-17 and IL-22 disrupt BBB tight junctions *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, T_H17 lymphocytes transmigrate efficiently across BBB-ECs, highly express granzyme B, kill human neurons and promote central nervous system inflammation through CD4⁺ lymphocyte recruitment.

T-helper type 1 (T_H1)^{1,2} and type 17 (T_H17) lymphocytes contribute to autoimmune inflammatory diseases³ including multiple sclerosis and its mouse model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)^{4,5}. Disruption of the BBB and trafficking of autoreactive T cells from the systemic compartment into the central nervous system (CNS) are important, early events in the development of multiple sclerosis lesions⁶. In support of this, T_H1 lymphocytes have been shown to migrate efficiently across the human BBB^{7,8}. To evaluate T_H17 lymphocyte migration to the brain relative to T_H1 cells, we employed an *in vitro* model of the human BBB using human brain-derived microvascular endothelial cells. We generated human T_H1 and T_H17 lymphocytes *in vitro* using peripheral blood CD4⁺ lymphocytes cultured with IL-12 and IL-23, respectively (**Supplementary Methods** online). Human T_H17 lymphocytes migrated more avidly across the BBB than did T_H1 or freshly isolated (*ex vivo*) CD4⁺ lymphocytes (**Fig. 1a**, $P < 0.01$). To ensure that the selective accumulation of T_H17 lymphocytes indeed reflects the preferential transmigration ability of T_H17 cells, we analyzed the intracellular cytokine profile of the cell population before and after migration across BBB-ECs, looking specifically at IL-17 and at IL-22, a recently identified cytokine product of T_H17 cells⁹⁻¹¹. We noted a significant enrichment in the number of IL-17⁺ and IL-22⁺-expressing CD4⁺CD45RO⁺ memory lymphocytes upon migration across the BBB (**Fig. 1b**, $P < 0.001$ for IL-17⁺ and $P < 0.05$ for IL-22⁺ cells, $n = 3$), confirming the ability of T_H17 lymphocytes to cross the BBB *in vitro*. To further substantiate these observations, we generated myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T_H1 and T_H17 lymphocytes from 2D2 mice *in vitro* and transferred these separately into T and B lymphocyte-deficient Rag1^{-/-} mice. Equal numbers of T_H cells were found in the CNS of Rag1^{-/-} mice 7 d after transfer, regardless of whether donor cells were polarized into T_H1 or T_H17

cells, confirming that T_H1 and T_H17 cells primed and expanded in the periphery access the CNS *in vivo* (**Fig. 1c**). To validate these human *in vitro* and mouse *in vivo* observations, brain sections from humans with multiple sclerosis and from unaffected controls were immunostained for CD45RO and IL-17 or IL-22. Numerous CD45RO⁺ cells immunopositive for IL-17 or IL-22 were detected in highly infiltrated multiple sclerosis lesions, but not in normal-appearing white matter or non-inflamed brain specimens (**Fig. 1d,e**). Taken together, these results emphasize the potential importance of T_H17 lymphocyte infiltration into the CNS and these lymphocytes' consequent involvement in lesion formation in multiple sclerosis and EAE.

So far, the encephalitogenic activity of T_H17 cells has been attributed to IL-17 (refs 12,13). To investigate whether the action of T_H17 cells extends beyond the proinflammatory influence of IL-17, we explored the possibility that T_H17 cells might express cytolytic molecules and therefore analyzed T_H17 cells for the expression of perforin, granzyme A and B. Notably, whereas virtually no *ex vivo* CD4⁺CD45RO⁺ cells produced cytolytic enzymes (data not shown), granzyme B was expressed in as many as 22.5% of IL-17–producing CD4⁺CD45RO⁺ cells and 17.3% of IL-22⁺ lymphocytes after 6 d of culture with IL-23 (**Fig. 1f**). Even more striking is that 60% of cells coexpressing IL-17 and IL-22 also expressed granzyme B (**Fig. 1g**). We therefore tested the capacity of granzyme B⁺ T_H17 cells to kill human fetal neuron–enriched cultures and found that they showed considerable cytolytic activity ($32.83 \pm 2.54\%$) as compared to unactivated T lymphocytes ($6.15 \pm 2.37\%$) (**Fig. 1h**, $P < 0.0001$, $n = 3$).

We next analyzed IL-17 receptor (IL-17R) and IL-22 receptor (IL-22R) expression on human BBB-ECs, and investigated whether IL-17 and IL-22 influence BBB integrity. IL-17R and IL-22R were detected on the surface of a subset of human BBB-ECs in primary culture (**Fig. 2a**; 23% of IL-17R⁺ and 16% of IL-22R⁺). *In situ*, however, IL-17R and IL-22R were undetectable in CNS material from subjects without multiple sclerosis. However, both receptors were strongly expressed on CNS vessels within heavily infiltrated multiple sclerosis lesions, colocalized with caveolin-1, a marker of brain endothelial cells (**Fig. 2b,c**).

We further investigated whether brain endothelial IL-17R and IL-22R were functional, and whether IL-17 and IL-22 could affect BBB permeability. Addition of 10 ng/ml of IL-17 or IL-22 to monolayers of human BBB-ECs induced a marked and sustained increase in the diffusion of fluorescence-labeled BSA (**Fig. 2d**). This effect was dose dependent, reached a plateau at 100 ng/ml and coincided, for IL-17, with a decrease in the expression of occludin and zonula occludens (ZO)-1, two important tight junction–associated molecules (**Fig. 2e**). A similar reduction of occludin, and to a lesser extent ZO-1, expression was demonstrated by western blotting in spinal cord homogenates from EAE mice (**Fig. 2f**). *In situ* staining further confirmed a decrease in ZO-1 immunoreactivity in cerebellar lesions of MOG-immunized mice (**Fig. 2f**). These results are in line with our recent data showing a disruption of tight-junction proteins in highly infiltrated vessels of multiple sclerosis lesions¹⁴. The exact mechanism mediating IL-22–induced BBB permeability remains uncertain, however.

We next explored the capacity of IL-17 and IL-22 to modulate lymphocyte migration across human BBB-ECs and found that IL-17 and IL-22 promote transmigration of human *ex vivo* CD4⁺ lymphocytes (**Fig. 2g**), most likely through enhanced BBB-EC–mediated secretion of CCL2 (or MCP-1) (**Fig. 2h**). IL-17 also induced IL-6 and CXCL8 (or IL-8) expression by BBB-ECs, whereas expression of TGF- β , ICAM-1, VCAM-1, CCL5 (or RANTES) and CXCL10 (or IP-10) remained unaffected (data not shown). Taken together, these results strongly suggest that T_H17 cells, through the action of IL-17 and IL-22, play a unique role in permeabilizing the human BBB both to soluble molecules and to circulating CD4⁺ lymphocytes.

Our study further refines the phenotype of human T_H17 lymphocytes as cells coexpressing IL-17, IL-22 and granzyme B, and provides strong evidence that IL-17 and IL-22 induce a breach in the BBB and promote the recruitment of additional CD4⁺ lymphocytes. Although IL-22 has the potential to influence the ability of T_H17 lymphocytes to gain access to the CNS, *in vivo* evidence indicates that IL-22 does not directly affect their encephalitogenicity (B.B., personal communication). We postulate that T_H17 cells produce multiple mediators contributing to their highly encephalitogenic potential, among them cytolytic enzymes such as granzyme B.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by funding from the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC) and from the Canadian Fund for Innovation to A.P. The animal studies were supported through grants from the US National MS Society and the Swiss National Science Foundation (B.B.). H.K., I.I., A.D.-D. and R.C. hold studentships from the MSSC and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR)/Strategic Training Initiative in Health Research Neuroinflammation Training Program. K.K. has a fellowship from the Center for Neurosciences in Zurich. N.A. holds a CIHR Senior Research Fellowship Phase 2. B.B. is a Neuroscience Scholar of the US National MS Society. A.P. is a Research Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and holds the Donald Paty Career Award of the MSSC. We thank I. Gutcher, S. Haak, D. Pasichnyk and J. Laganière for their excellent technical assistance. We are grateful to V.K. Kuchroo (Harvard Medical School), who kindly provided the 2D2 mice, and to J.P. Antel (McGill University) for providing assistance and human tissue.

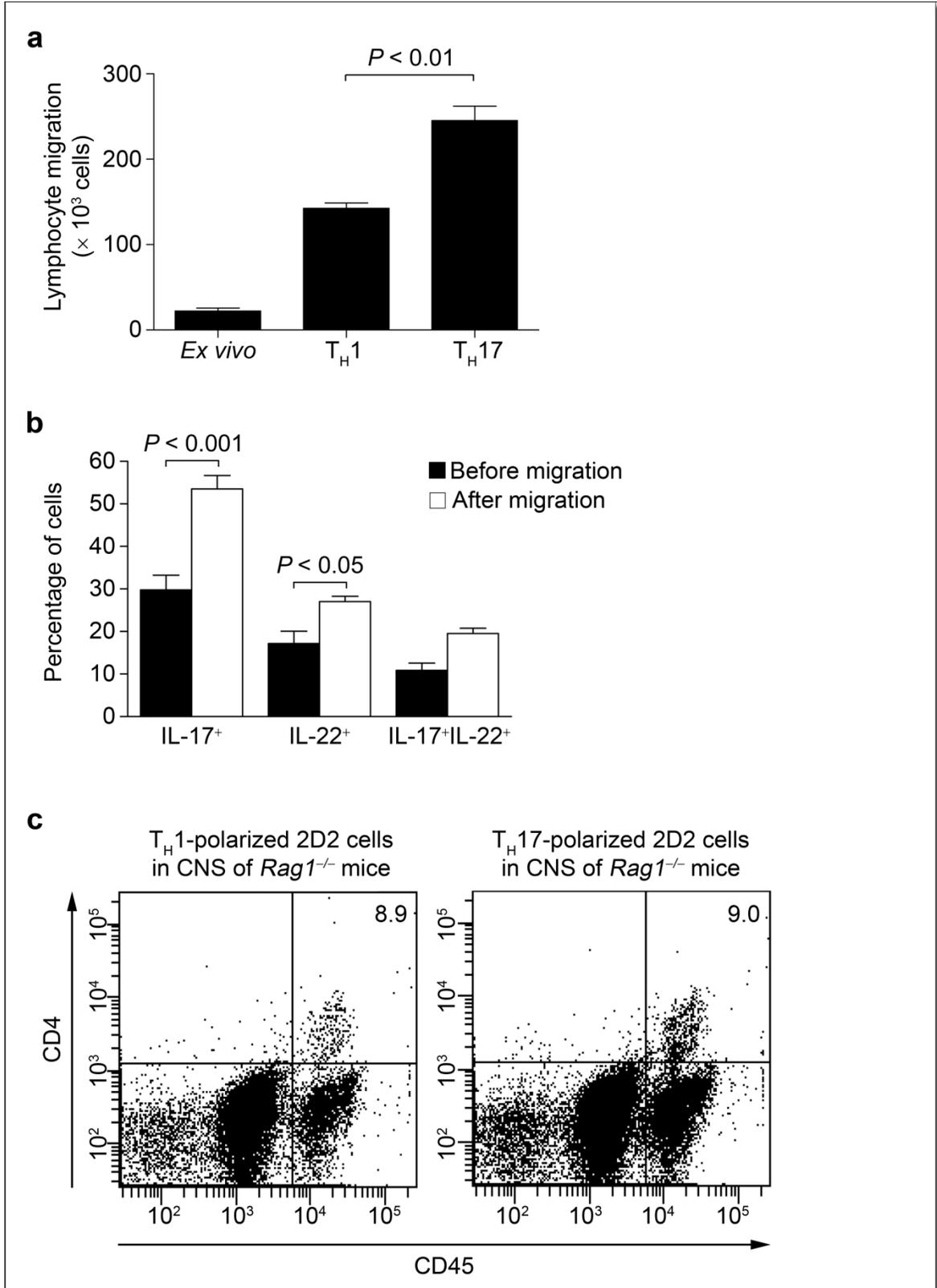
AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.K. conducted most of the experiments; K.K. performed and analyzed animal studies; I.I. and A.D.-D. contributed to immunostaining and *in vitro* protocols. R.C. assisted with confocal microscopy and performed some EAE experiments; M.B. assisted with BBB-EC isolation and culture; F.G. performed the killing assay; N.A. provided critical input on data analysis; B.B. designed and supervised the animal studies; H.K. and A.P. designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript; A.P. secured the funding.

REFERENCES

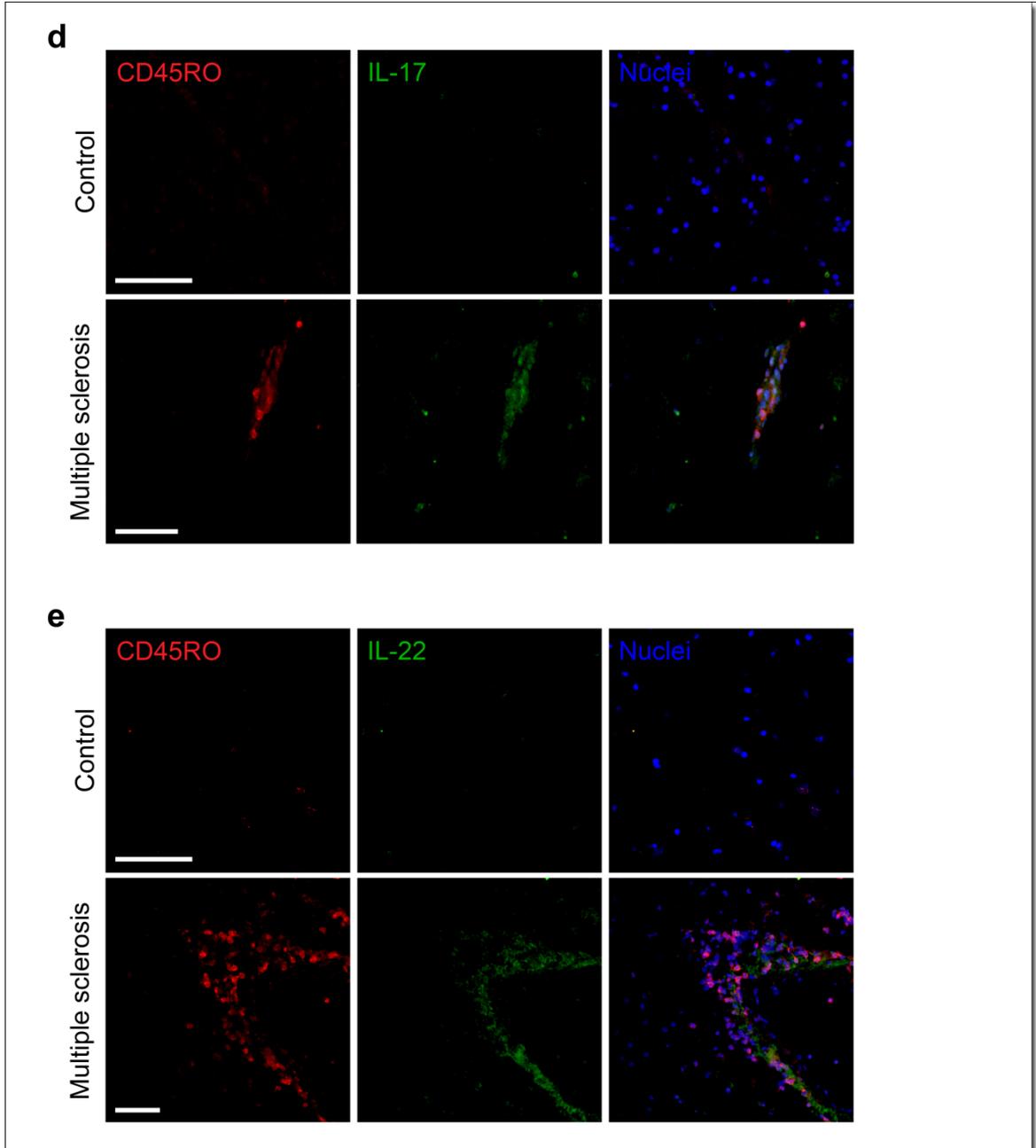
1. Renno, T. *et al. Int. Immunol.* **6**, 347-354 (1994).
2. Bettelli, E. *et al. J. Exp. Med.* **200**, 79-87 (2004).
3. Steinman, L. *Nat. Med.* **13**, 139-145 (2007).
4. Cua, D.J. *et al. Nature* **421**, 744-748 (2003).
5. Langrish, C.L. *et al. J Exp. Med.* **201**, 233-240 (2005).
6. Sospedra, M. & Martin, R. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 683-747 (2005).
7. Biernacki, K., Prat, A., Blain, M. & Antel, J.P. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 1127-1136 (2001).
8. Prat, A., Biernacki, K. & Antel, J.P. *J Autoimmun.* **24**, 119-124 (2005).
9. Liang, S.C. *et al. J. Exp. Med.* **203**, 2271-2279 (2006).
10. Chung, Y. *et al. Cell Res.* **16**, 902-907 (2006).
11. Zheng, Y. *et al. Nature* **445**, 648-651 (2007).
12. Komiyama, Y. *et al. J. Immunol.* **177**, 566-573 (2006).
13. Uyttenhove, C. & Van, S.J. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2868-2874 (2006).
14. Wosik, K. *et al. J. Neurosci.* **27**, 9032-9042 (2007).

Figure 1 a–c



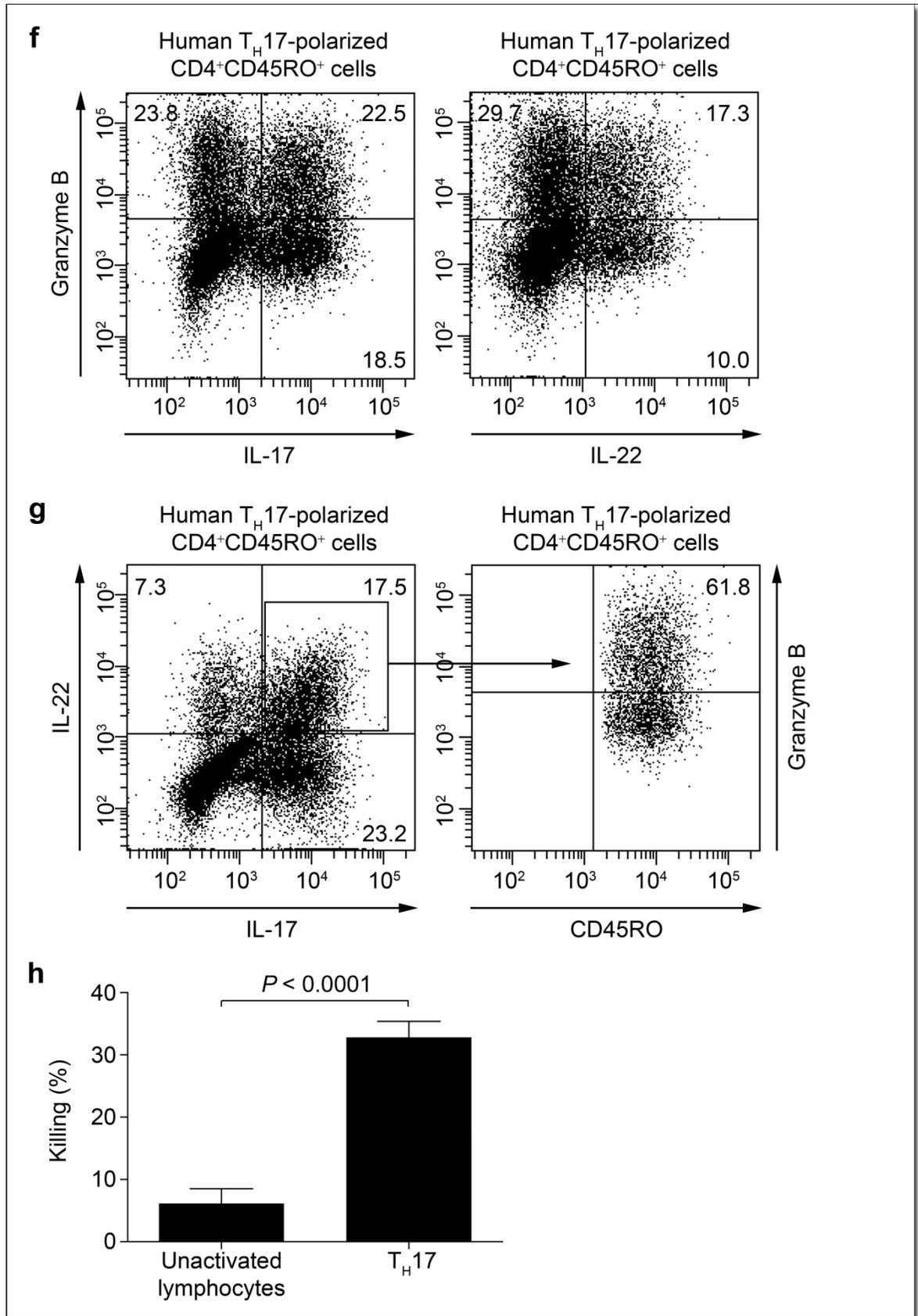
Kebir et al., Nat. Med. 13, 1173 (2007)

Figure 1 d–e



Kebir et al., Nat. Med. 13, 1173 (2007)

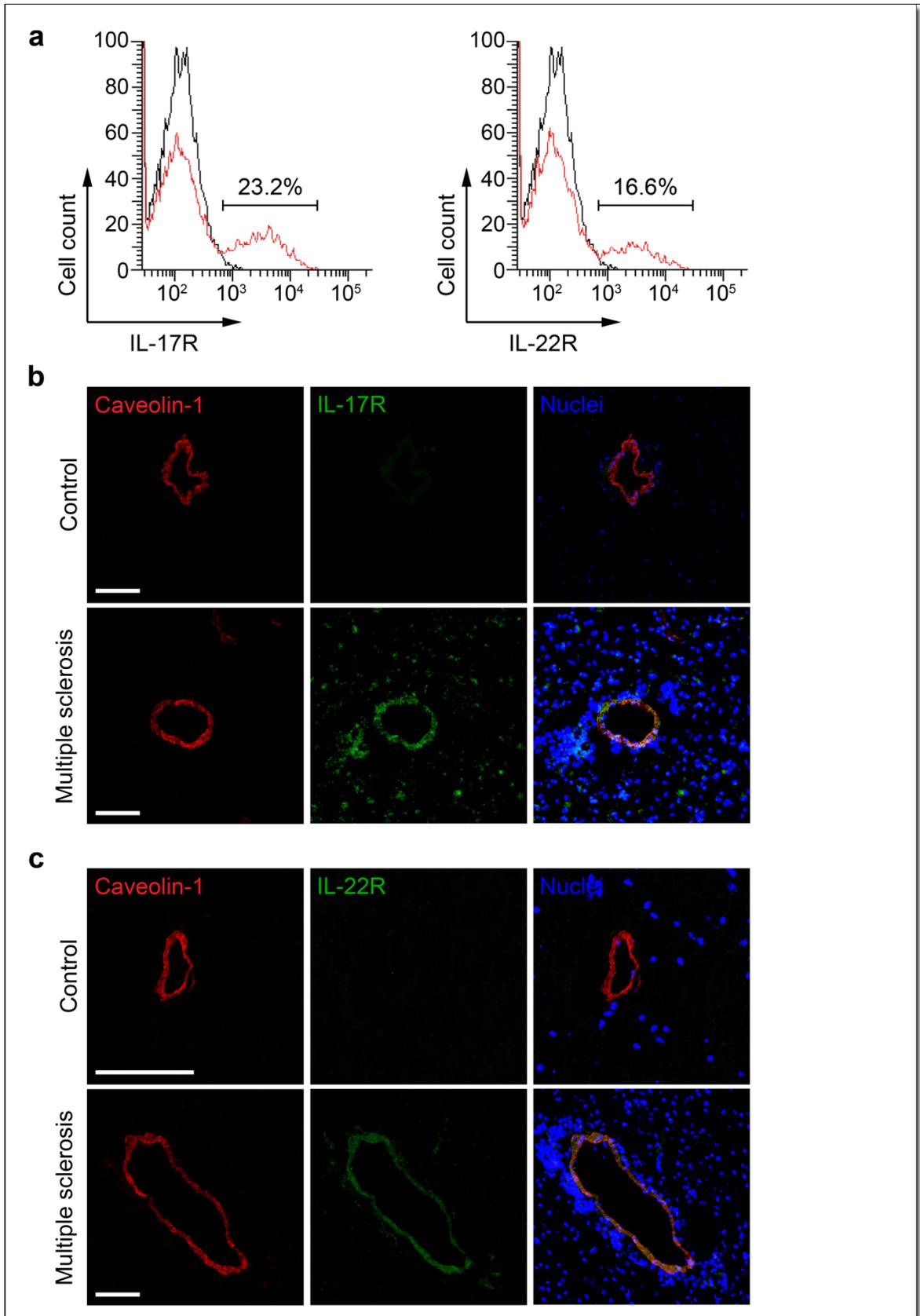
Figure 1 f-h



Kebir et al., Nat. Med. 13, 1173 (2007)

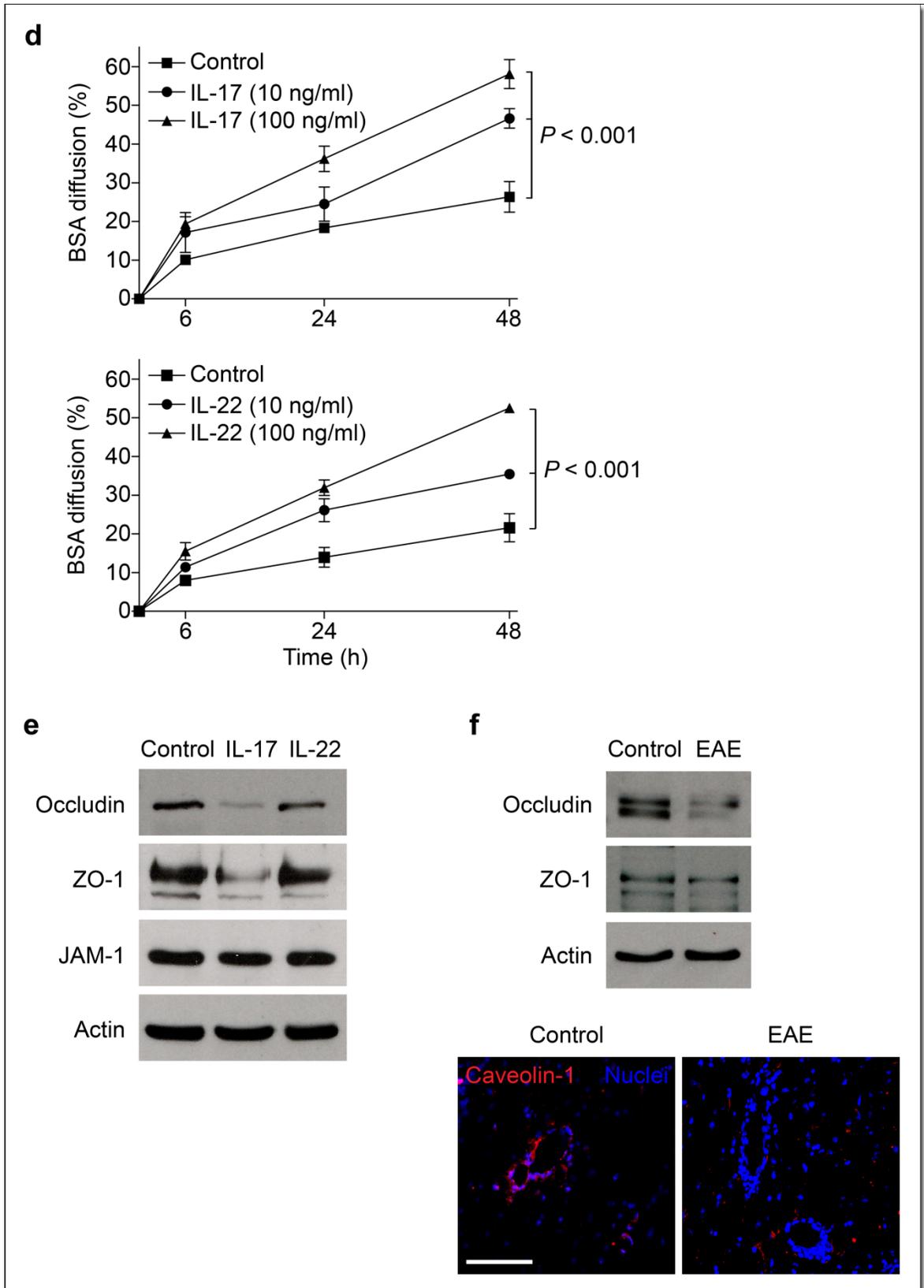
Figure 1 T_H17 lymphocytes migrate efficiently across the BBB *in vitro* and *in vivo* and kill human neurons. (a) Human CD4⁺CD45RO⁺ T_H17, CD4⁺ T_H1 (both generated *in vitro*, see **Supplementary Methods**) and *ex vivo* CD4⁺ lymphocytes were allowed to migrate across human BBB-ECs in a modified Boyden chamber assay (ref. 14 and **Supplementary Methods**) for 18 h. Significantly more T_H17 lymphocytes migrated than either T_H1 or *ex vivo* CD4⁺ lymphocytes. (b) CD4⁺CD45RO⁺ T_H17 lymphocytes were allowed to migrate across human BBB-ECs for 18 h. Cells were stained for IL-17 and IL-22 before and after migration. The cytokine profile revealed the preferential migration of IL-17⁺ and IL-22⁺ lymphocytes. (c) Immune cells from lymph nodes and spleen of MOG_{35–55}-immunized 2D2 animals were polarized towards T_H1 or T_H17 and transferred to *Rag1*^{-/-} mice, and CD45^{hi}CD4⁺ lymphocytes were isolated from the CNS 7 d after transfer. Shown is a representative flow cytometry dot plot of CNS cell content from *Rag1*^{-/-} mice injected with either T_H1- (left) or T_H17-polarized (right) 2D2 lymphocytes (*n* = 4 mice per group). (d) Human CNS postmortem material from unaffected individuals (control, non-inflamed; above) and heavily infiltrated CNS material from individuals with multiple sclerosis (below) were immunostained for CD45RO (red), IL-17 (green) and nuclear stain TO-PRO3 (blue). Confocal microscopy imaging confirmed the presence of IL-17⁺CD45RO⁺ cells (yellow) in infiltrated multiple sclerosis lesions but not in control CNS. Bar, 75 μm. (e) Similarly, IL-22⁺CD45RO⁺ staining was observed in multiple sclerosis lesions, but not in control CNS material. (f) Human CD4⁺CD45RO⁺ T_H17-polarized lymphocytes were stained for CD45RO, IL-17, IL-22 and granzyme B. Both IL-17- and IL-22-producing lymphocytes expressed granzyme B (22.5% and 17.3%, respectively). (g) More than 60% of IL-17⁺IL-22⁺ lymphocytes highly expressed granzyme B. Granzyme A and perforin were not detected in T_H17 cells, whether or not these cells produced IL-22 (data not shown). (h) The cytotoxic activity of T_H17 lymphocytes was assessed using neuron-enriched cultures obtained from human fetal CNS material and compared to that of unactivated T lymphocytes. All data shown are representative of the mean ± s.e.m. of three independent experiments.

Figure 2 a–c



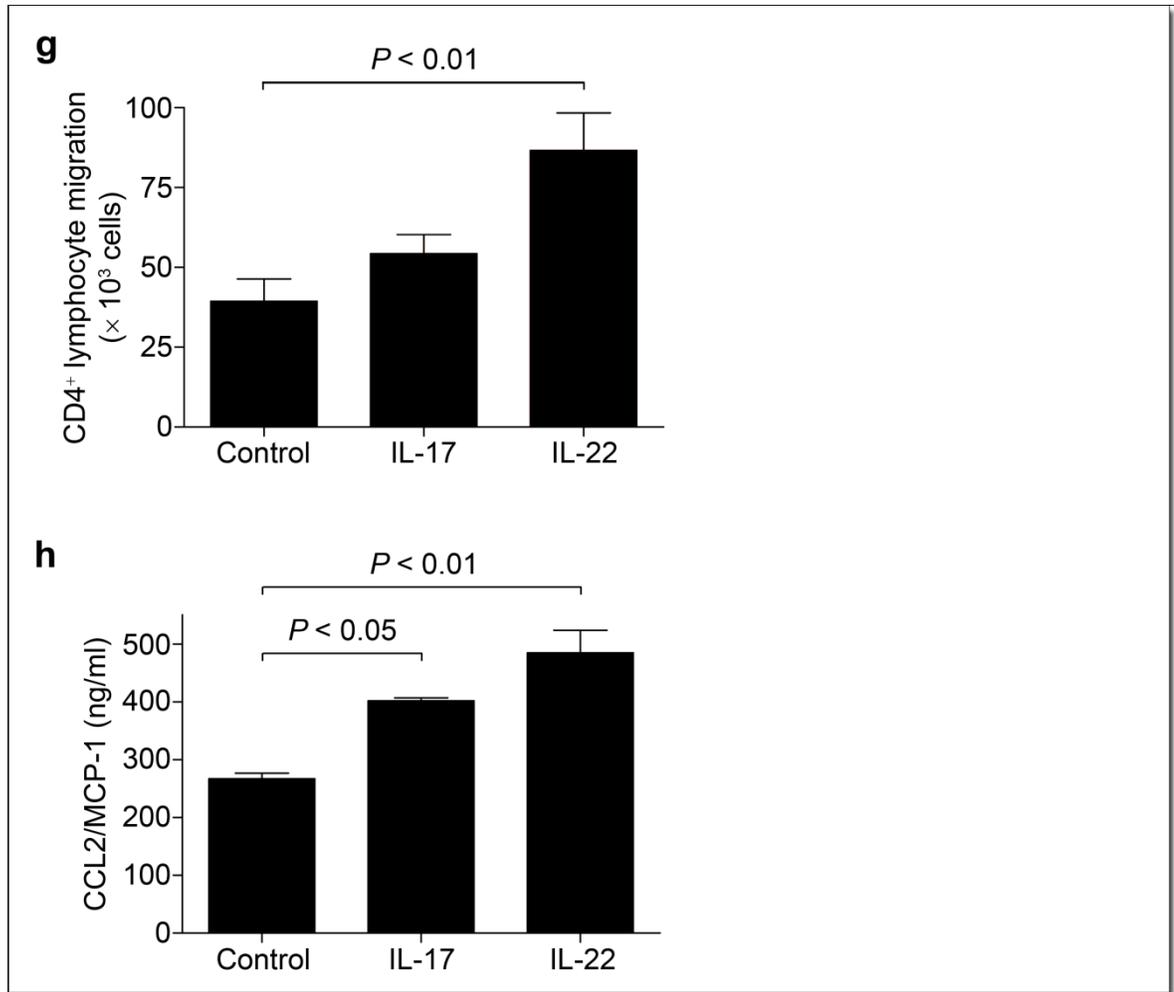
Kebir et al., *Nat. Med.* 13, 1173 (2007)

Figure 2 d-f



Kebir et al., Nat. Med. 13, 1173 (2007)

Figure 2 g–h



Kebir et al., Nat. Med. 13, 1173 (2007)

Figure 2 IL-17 and IL-22 receptors are expressed on human brain endothelium, and their activation permeabilizes the BBB. (a) Unactivated human BBB-ECs grown in primary culture were stained for IL-17R and IL-22R, revealing their expression on the surface of 23.2% and 16.6% of BBB-ECs, respectively. (b) Human CNS postmortem material from unaffected individuals (control, non-inflamed; above) and heavily infiltrated CNS material from individuals with multiple sclerosis (below) were immunostained for IL-17R (green), caveolin-1 (red) and nuclear stain TO-PRO3 (blue). Confocal microscopy imaging confirmed the expression of IL-17R on caveolin-1⁺ endothelium in inflamed CNS material. IL-17R expression was undetectable in control CNS material. Bar, 75 μm. (c) Similarly, IL-22R staining was observed on endothelial cells in multiple sclerosis lesions, but not in controls. (d)

Human BBB-ECs were grown in Boyden chambers and treated with IL-17 (top) or IL-22 (bottom). Permeability of the monolayers was monitored with fluorescent BSA, showing that BBB-EC monolayer permeability increased after treatment with either IL-17 or IL-22. **(e)** Western blot for the tight-junction proteins occludin, ZO-1 and junction adhesion molecule (JAM)-1 from human BBB-ECs revealed disruption of occludin and ZO-1 by IL-17 (100 ng/ml, 18 h). **(f)** Western blot for tight-junction proteins in spinal cord homogenates of MOG_{35–55}-immunized EAE mice revealed a similar reduction in occludin and ZO-1. *In situ* immunostaining for ZO-1 (red) and nuclear stain TO-PRO3 (blue) in normal-appearing cerebellar white matter (control) and in infiltrated and demyelinated cerebellar lesions from C57BL/6 mice immunized with MOG_{35–55} (EAE, grade 4). Confocal microscopy imaging confirmed disruption of ZO-1 around infiltrated vessels. Bar, 75 μ m. **(g)** Freshly isolated peripheral blood human CD4⁺ lymphocytes were allowed to migrate for 18 h across IL-17– (100 ng/ml) or IL-22–treated (100 ng/ml) human BBB-ECs. Both cytokines promoted migration of human *ex vivo* CD4⁺ lymphocytes across human BBB-ECs, as compared to control. **(h)** CCL2 (or MCP-1) secretion by human BBB-ECs was assessed by ELISA in untreated and IL-17– or IL-22–treated cultures (100 ng/ml, 18 h). Both IL-17 and IL-22 upregulate CCL2 secretion by human BBB-ECs. All data shown represent the mean \pm s.e.m. from three independent experiments performed in triplicate.

SUPPLEMENTARY METHODS

***In vitro* T_H polarization.** We isolated mononuclear cells from peripheral blood of healthy human donors by density gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). We purified human CD14⁺ monocytes, CD4⁺ T lymphocytes and memory (CD4⁺CD45RO⁺) T lymphocytes by magnetic sorting (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. The cell purity was consistently >97%, as determined by flow cytometry. T cells (1×10^6 cells/ml) were cultured with autologous monocytes as antigen-presenting cells, at a two to one ratio, and stimulated with CD3-specific antibody (2.5 μ g/ml, clone OKT3, eBioscience) in RPMI 1640 medium supplemented with 5% human serum, 2 mM L-glutamine and antibiotics (Sigma). For T_H1 polarization, we added recombinant human IL-12 (10 ng/ml) and antibody to human IL-4 (5 μ g/ml, clone 3007), whereas for T_H17 polarization, T cells were cultured in the presence of recombinant human IL-23 (10 ng/ml) as well as with neutralizing antibodies against IFN- γ (5 μ g/ml, clone K3.53) and against IL-4. Recombinant cytokines and antibodies were purchased from R&D Systems. We harvested cells on d 6 for cytokine determination using commercially available ELISA kits for IFN- γ (BD Biosciences), IL-17 (Biosource) and IL-22 (R&D Systems) following the manufacturer's instructions. Levels of IL-17 and IL-22 were consistently higher in IL-23-stimulated lymphocytes, as compared to T_H1 and *ex vivo* lymphocytes (data not shown).

Intracellular cytokine staining and flow cytometry. After 6 d in culture under T_H1- or T_H17-biased conditions, we stimulated the cells 6 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (20 ng/ml) and Ionomycin (1 μ g/ml) in the presence of brefeldin A (2 μ g/ml) (all from Sigma). We first stained cells for surface antigens CD3 and CD45RO then fixed and permeabilized them in 4% (w/v) paraformaldehyde containing 1% saponin. Subsequently, we added antibodies specific for human IL-17 (Biosource), IL-22 (R&D Systems), perforin, granzyme A (BD Biosciences) and granzyme B (Caltag Laboratories). IL-17R and IL-22R expression on BBB-ECs was detected using unconjugated antibodies (R&D Systems) incubated with phycoerythrin-conjugated goat antibody specific to immunoglobulins (BD Biosciences). All staining assays were performed with the appropriate matched isotype control. Samples were

acquired on a BD Biosciences LSR II flow cytometer and analyzed using BD FACSDiva Software.

BBB-EC isolation & culture. We isolated BBB-ECs from CNS tissue specimens of temporal lobe resections from young adults undergoing surgery for the treatment of intractable epilepsy, as previously described^{1,2}. Informed consent and ethic approval were given prior to surgery (Comité d'Evaluation de la Recherche du CHUM, ethic approval number HD04.046). Cultures express endothelial markers factor VIII, Ulex Agglutenens Europaensis-1 binding sites, and antigen HT-7 until passage seven to eight. No immune reactivity with β -tubulin, α -myosin or glial fibrillary acidic protein (GFAP) could be detected, confirming the absence of contaminating smooth muscle cells or astrocytes.

Migration assays. Migration assays were performed on a 24-well plate modified Boyden chamber as previously described^{1,3}. In brief, we seeded 3×10^4 human brain ECs on top of a gelatin-coated 3 μ m pore size membrane in EC culture media supplemented with 40% (v/v) astrocyte-conditioned media, shown to induce and maintain BBB characteristics *in vitro*. After 3 d of culture, the ECs had formed a confluent monolayer. At that point, when applicable, cells were treated for 24 h with 100 ng/ml of recombinant human IL-17 or IL-22 (R&D Systems). The next day, ECs were washed and a suspension of 1×10^6 T lymphocytes/ml was loaded in the upper chamber. We assessed the ability of both T_H1 and T_H17 lymphocyte subsets to cross the monolayer by counting the absolute number of cells that transmigrated to the lower chamber after 18 h, out of the 1×10^6 cells initially loaded in the upper chamber. All migration data shown represent at least three independent experiments performed in triplicate.

Permeability assays. We performed the permeability assays on the *in vitro* model of the human BBB, as described for the migration experiments. We treated BBB-ECs on d 3 with 10 ng/ml or 100 ng/ml of recombinant human IL-17 or IL-22. After 24 h, we replaced the media and applied 50 μ g/ml of fluorescein isothiocyanate-labeled BSA (Invitrogen) to the upper chamber. Fifty μ l samples were taken from the upper and lower chambers at different time points over a 3 d period and the fluorescence intensity in these samples was measured using a FL600 microplate

fluorescent reader (Biotek). The diffusion rate, a measure of the permeability of BBB-ECs, was expressed as a percentage and calculated as follows: $[\text{BSA lower chamber}] \times 100 / [\text{BSA upper chamber}]$. Each experiment was repeated at least three times in triplicate to ensure reproducibility.

Immunohistofluorescence staining for IL-17, IL-22, IL-17R and IL-22R. Frozen CNS material from healthy donors (non-neurological disease controls) and MS subjects was obtained after autopsy. Ten μm sections were cut, fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 1% triton X-100 for 5 min. Sections were blocked in HHG (1 mM HEPES, 2% horse serum, 10% goat serum in HBSS, Sigma) plus 0.5% triton X-100 for 1 h at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with mouse antibodies specific to human IL-17 (1/20, eBiosciences) or human IL-22 (1/20, R&D Systems), and allophycocyanin-conjugated mouse antibody specific to human CD45RO (1/10, BD Biosciences). For the receptors, we used goat primary antibodies against human IL-17R and human IL-22R (1/20, R&D Systems) and rabbit antibody specific to human caveolin-1 (1/50, Santa Cruz). After several washes, IL-17, IL-22, IL-17R and IL-22R stains were amplified with biotin-conjugated goat antibody specific to mouse immunoglobulins (1/300) followed by streptavidin-fluorescein isothiocyanate (1/300 for IL-17 and IL-22, 1/1,000 for IL-17R and IL-22R, for 30 min at room temperature). CD45RO staining was visualized with allophycocyanin-specific antibody raised in rabbit (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Biomeda) followed by Cy3-coupled goat antibody specific to rabbit immunoglobulins (1/300, Jackson ImmunoResearch). Caveolin-1 staining was visualized with Cy3-coupled goat antibody specific to rabbit immunoglobulins (1/400). Nuclei were stained with TO-PRO3 (1/300 in phosphate buffered saline for 15 min, pre-treatment with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A for 30 min, Molecular Probes). All control staining were performed omitting the primary antibody, in which case no immunopositive cells could be detected. Staining was visualized using a Leica SP5 confocal microscope and analyzed with Leica LAS AF Software.

Cytotoxicity assays of fetal human neuron-enriched cultures. Brain tissue from human fetuses of 16–20 weeks gestational age were obtained following therapeutic abortion according to guidelines approved by the Research and Ethic Committee,

University of Alberta, and informed consent was given by the parents. Neuron-enriched cultures (>90% purity) were prepared as previously described⁴, and 1×10^5 cells were plated in individual chambers 72 h prior to the killing assay. 1×10^5 unactivated lymphocytes and IL-23-stimulated T_H17 cells were added to the neurons for 24 h, fixed with 4% paraformaldehyde and labeled with a monoclonal antibody to microtubule-associated protein (MAP)-2 (1/1,000, Sigma). Neuron (MAP-2⁺ cells) survival was evaluated counting six random fields in each well using the 40 × microscope objective. For every condition in each set of experiments, four wells were counted to obtain the mean number of neurons remaining in culture. In figure 1h, data are expressed as the percentage of killing and represent 100% – percentage of survival, from three independent experiments.

Animals. *Rag*^{-/-} mice were purchased from The Jackson Laboratory and were bred under specific pathogen-free conditions. The 2D2 (MOG-TCR-Tg) mice were provided by Dr. V.K. Kuchroo (Harvard Medical School). Animal experiments and breeding were approved by the Swiss Veterinary Office (69-200370-2003).

Adoptive transfer of T_H1 and T_H17 cells. 2D2 mice were immunized subcutaneously with 200 µg of MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; obtained from GenScript) emulsified in complete Freund adjuvant (Difco). Seven days later, mice were sacrificed using CO₂. Spleens, axillary and inguinal lymph nodes were isolated, treated with 0.5 mg/ml DNase and 1 mg/ml Liberase (Roche) for 30 min at 37°C and homogenized. The cells were cultured for 4 d in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Gibco) in the presence of 15 µg/ml of MOG₃₅₋₅₅ peptide, 10 µg/ml PolyI:C (Fluka) and either 2.5 ng/ml of recombinant IL-12 (PeproTech) for the promotion of T_H1 cells or 10 ng/ml of recombinant IL-23 (PeproTech) for the promotion of T_H17 cells. Cells were harvested, washed and injected into recipient mice (10×10^6 cells/mouse). Animals received 200 ng pertussis toxin (Sigma) intraperitoneally at the time of transfer and 48 h later.

Flow cytometry. Mice were sacrificed 7 or 9 d after adoptive transfer using CO₂ and spinal cords and brains were isolated, treated with 0.5 mg/ml DNase and 1 mg/ml Liberase for 30 min at 37°C, homogenized and strained through a nylon filter with a

pore size of 100 μm (Fisher). After centrifugation, cells were resuspended in 30% Percoll (Pharmacia) and were centrifuged at 18,500 g for 30 min at 4°C. Viable immune cells were collected and washed extensively before being stained. For flow cytometry, antibodies (all purchased from BD Pharmingen) were incubated with cells for 20 min at 4°C and then cells were analyzed with a FACSCanto (BD Pharmingen) and FACSDiva software. Post-acquisition analysis was performed with FACSDiva Software (BD Pharmingen).

Western blots for tight junction proteins. For western blots for ZO-1, occludin, JAM-1 and actin, we lysed BBB-ECs in NP-40 buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 and 0.5% NP-40) supplemented with protease inhibitors. Fifty μg of total protein were electrophoresed on a 10% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. Proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Biorad) and blocked for 1 h at room temperature in 5% milk. We incubated the membranes overnight with rabbit antibody specific to human occludin, rabbit antibody specific to human ZO-1 (1/250, Zymed), mouse antibody specific to human JAM-1 (1/500, BD Bioscience) or mouse antibody specific to human actin (1/1,000, 1 h at room temperature, MP Biomedicals) followed by an incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat antibody specific to rabbit immunoglobulins or rabbit antibody specific to mouse immunoglobulins (1/1,000, 1 h at room temperature, DakoCytomation). Specific binding was visualized using the ECL system (Amersham Biosciences).

Immunohistofluorescence staining for ZO-1. Cerebellum tissue samples from MOG-immunized C57BL/6 mice at the peak phase of EAE were frozen in O.C.T. and cut into 10 μm sections. Sections were permeabilized and blocked as described above and immunostained overnight at 4°C with ZO-1-specific antibody (1/50, Zymed). ZO-1 signal was amplified with biotin-conjugated goat antibody specific to rabbit immunoglobulins (1/300) followed by streptavidin-Cy3 (1/300) antibody. Nuclei were visualized with TO-PRO3 (1/300). ZO-1 staining in highly infiltrated vessels was compared to the signal in normal-appearing white matter of the same animals.

ELISA. BBB-ECs were treated with recombinant human IL-17 (100 ng/ml), recombinant human IL-22 (100 ng/ml) or both. We collected supernatants at 24, 48

and 72 h and assessed for secretion of CCL2 (or MCP-1) by ELISA, using a commercially available kit from BD Biosciences. ELISAs were carried out following the manufacturer's instructions. Standards and samples were run in duplicate.

Statistical analysis. Migration data are expressed as the mean \pm s.e.m. For cytokine level comparisons and migration assays, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by Bonferroni multiple comparison post-test. Comparison of IL-17 and IL-22 treatments in permeability studies was done using two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Differences between groups were considered significant when $P < 0.05$.

REFERENCES

1. Biernacki, K., Prat, A., Blain, M. & Antel, J.P. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 1127-1136 (2001).
2. Ifergan, I. *et al. Ann. Neurol.* **60**, 45-55 (2006).
3. Prat, A., Biernacki, K. & Antel, J.P. *J Autoimmun.* **24**, 119-124 (2005).
4. Giuliani, F., Goodyer, C.G., Antel, J.P. & Yong, V.W. *J. Immunol.* **171**, 368379 (2003).

ARTICLE II

Titre : Preferential recruitment of interferon- γ -expressing T_H17 cells in multiple sclerosis.

Journal : Annals of Neurology. 2009. Sep ;66(3) :390-402.

Auteurs : Hania Kebir, Igal Ifergan, Jorge Iván Alvarez, Monique Bernard, Josée Poirier, Nathalie Arbour, Pierre Duquette & Alexandre Prat

Contributions : Les hypothèses de travail ont émergé des données elles-mêmes. Le Dr Ifergan m'a secondée dans l'élaboration et la mise en place du protocole d'induction de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) par transfert adoptif de lymphocytes T. Il m'a aussi épaulée pour toutes les expériences animales. Le Dr Alvarez a chapeauté l'ensemble des expériences d'imagerie confocale et les procédures d'immunohistochimie. La Dre Bernard était responsable du maintien des cultures de cellules endothéliales humaines. Mme Josée Poirier, le Dr Prat et le Dr Duquette ont prélevé le sang et fourni les données cliniques des patients atteints de SEP. La Dre Arbour a participé aux échanges scientifiques. J'ai rédigé le manuscrit avec l'appui du Dr Prat. Toutes les étapes du projet ont été réalisées sous la supervision et la direction du Dr Prat.

Preferential Recruitment of Interferon- γ -Expressing T_H17 Cells in Multiple Sclerosis

Hania Kebir, MSc,¹ Igal Ifergan, MSc,¹ Jorge Ivan Alvarez, PhD,¹

Monique Bernard, MSc,¹ Josée Poirier, BScN,² Nathalie Arbour, PhD,¹

Pierre Duquette, MD,² and Alexandre Prat, MD, PhD,^{1,2}

¹Neuroimmunology Research Unit, Center for Excellence in Neuromics, and
²Multiple Sclerosis Clinic, University of Montreal Hospital Center–Notre-Dame
Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence should be addressed to A.P. (a.prat@umontreal.ca).

Running head: IFN- γ -expressing T_H17 cells in MS

Objective: There is substantial evidence supporting the role of interferon (IFN)- γ -producing T helper (T_H) 1 and interleukin (IL)-17-expressing T_H17 lymphocytes in multiple sclerosis (MS) and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis (EAE). However, to date, little is known about the potential cooperative interplay between these two cytokines. In the current study, we sought to evaluate the frequency of IFN- γ -expressing T_H17 lymphocytes in MS and EAE, and study their recruitment into the central nervous system (CNS).

Methods: Human T_H17 lymphocytes were expanded *in vitro* from the blood of healthy controls and relapsing MS patients using IL-23. Immune cell migration to the CNS was assessed *in vitro* with primary cultures of human blood-brain barrier (BBB)-derived endothelial cells, and *in vivo* in EAE mice.

Results: We demonstrate that in response to IL-23, human memory lymphocytes expand into a TH17 phenotype, with a subpopulation of cells simultaneously expressing IFN- γ and IL-17. We note that lymphocytes obtained from the blood of relapsing MS patients have an increased propensity to expand into IFN- γ -producing T_H17 cells and identify numerous T lymphocytes co-expressing IL-17 and IFN- γ in brain tissue of MS patients. We also find lymphocytes expressing both the T_H1- and the T_H17-associated transcription factors ROR γ t and T-bet, *in situ* and *in vitro*. We further provide *in vitro* and *in vivo* evidence that IFN- γ ⁺ T_H17 lymphocytes preferentially cross the human BBB and accumulate in the CNS of mice during the effector phase of EAE.

Interpretation: Our data underscore the involvement of IFN- γ ⁺ T_H17 lymphocytes in the pathology of MS and EAE and their preferential recruitment into the CNS during inflammatory events.

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disorder of the central nervous system (CNS) characterized by multifocal areas of leukocyte infiltration, demyelination, and axonal damage. Abundance of immune cells and their products (cytokines, chemokines, and immunoglobulins) in MS plaques, and their accumulation in the cerebrospinal fluid of affected individuals, support the notion that MS is a CNS-targeted inflammatory disorder.^{1,2} Typically, demyelination is associated with an infiltration of memory CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes, effector memory CD8⁺ T lymphocytes, macrophages, and dendritic cells that arise from migration of peripheral blood immune cells across CNS microvascular endothelial cells (ECs) forming the blood-brain barrier (BBB).³⁻⁹

Myelin-specific T helper (T_H) 1 lymphocytes (ie, CD4⁺ cells driven by interleukin [IL]-12 to secrete interferon [IFN]- γ) were long thought to be the only disease-inducing cells in MS and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis (EAE).^{10,11} However, a large body of evidence now points to the additional involvement, along with T_H1 cells, of myelin-reactive T_H17 lymphocytes (ie, CD4⁺ lymphocytes expressing IL-17 and IL-22) as important co-effectors of disease in EAE^{12,13} and MS.^{4,14} Naive recipient animals, when transferred with T_H17 lymphocytes, show clinical signs and some pathological features of EAE.¹² However, IL-17 neutralization only confers partial protection against EAE,¹⁵ and new evidence based on studies on genetic deficiency of IL-17 suggests that the hallmark T_H17 cytokine would only play a modest role in the development of EAE pathology.¹⁶ In addition, there are now compelling and undisputed data supporting the notion that both myelin-specific IL-12– and IL-23–driven T lymphocytes are able to induce EAE.¹⁷ Although the current literature does not convincingly determine whether single cytokines such as IL-17 or IFN- γ are sufficient to induce disease, it is likely that any combination of factors produced by IL-12–driven T_H1 or IL-23–driven T_H17 cells will participate in the myelin-specific CNS-targeted inflammatory process. Although simultaneous expression of IL-17 and IFN- γ at the single cell level was recently documented by Lee et al.,¹⁸⁻²⁰ co-expression of these cytokines by a specific lymphocyte population remains a topic of debate, and their relevance to MS and EAE is unknown.

We and others have previously demonstrated that IFN- γ can activate brain endothelium and upregulate the expression of specific adhesion molecules on the surface of BBB-ECs.²¹ On the other hand, IL-17 and IL-22, molecules secreted by T_H17 lymphocytes, both have the capacity to disrupt the BBB and promote leukocyte recruitment to the CNS.⁴ In the current report, we identified using the peripheral blood of acutely relapsing MS patients, a subpopulation of T_H17 lymphocytes that, when stimulated with IL-23, coexpress IFN- γ and IL-17. We provide evidence that these cells migrate avidly across the BBB, by the use of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expressed on the endothelium. We further demonstrate a selective accumulation of these IFN- γ -IL-17 coexpressing cells in the CNS of EAE animals, during the effector phase of the disease.

Materials and Methods

Patient Characteristics

Twelve patients with clinically definite MS characterized by a relapse-remitting disease course were recruited from the Multiple Sclerosis Clinic of the Notre-Dame Hospital (Montreal, Canada). The age of the patients ranged from 26 to 47 years, with a mean of 37.8 ± 2.2 years. Eight of the MS patients were in the acute phase of disease (relapse), defined by the occurrence of new neurological symptom lasting at least 24 hours. The remaining 4 patients were clinically stable and showed no sign of disease activity. None of the patients received immunosuppressive, immunomodulatory, or steroid therapy for at least 6 months prior to blood collection. Eight healthy women volunteers (mean age, 34.3 ± 2.5 years) were included as controls. Informed written consent was obtained from all participating subjects, in accordance with the local ethics committee (BH 07.001).

Human T_H Cell Expansion and Culture

Human T_H1 and T_H17 lymphocyte expansion and culture were performed as described.⁴ In brief, peripheral blood mononuclear cell suspensions of healthy donors or MS patients were obtained by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (GE Healthcare, Oakville, ON, Canada). Human CD14⁺ monocytes, CD4⁺ T lymphocytes, and naive (CD4⁺CD45RA⁺) and memory (CD4⁺CD45RO⁺) T cells were purified by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) according to the manufacturer's instructions. Cell purity was consistently >97%, as determined by flow cytometry. T cells (0.5×10^6 cells/ml) were cultured with autologous monocytes at a 2:1 ratio, and stimulated with anti-CD3 (2.5 µg/ml, clone OKT3, eBioscience, San Diego, CA) in RPMI 1640 medium supplemented with 5% human serum, 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma, Oakville, ON, Canada). For T_H1 polarization, recombinant human (rh) IL-12 (10ng/ml) and anti-human IL-4 antibody (5 µg/ml, clone 3007) were added, whereas for T_H17 lymphocyte expansion, T cells were cultured in the presence of rhIL-23 (10ng/ml), as well as with neutralizing antibodies against IFN-γ (5 µg/ml, clone K3.53) and against IL-4. Recombinant cytokines and antibodies were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Cells were harvested on day 4–6 for cytokine

determination using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for IFN- γ (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada), IL-17 (Biosource, Carlsbad, CA), and IL-22 (R&D Systems).

Mice

Six- to 8-week-old female wild-type C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Montreal, QC, Canada). All animal protocols were approved by the Institutional Animal Protection Committee of the University of Montreal Hospital Center (N07027PAs).

Active Induction of EAE

Mice were immunized subcutaneously with 200 μ g of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅ peptide (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX) emulsified in complete Freund's adjuvant supplemented with 600 μ g of *Mycobacterium tuberculosis* (both from Difco, Detroit, MI). Pertussis toxin (500ng) was injected intraperitoneally (i.p.) on the day of immunization and 48 hours later. The severity of the disease was monitored daily and graded on a scale of 0–5 as follows: 0, no clinical symptoms; 1, limp tail; 2, hind limb weakness and/or ataxia; 3, hind limb paralysis; 4, hind and fore limb paralysis; 5, moribund.

Adoptive Transfer of EAE

Spleen and inguinal lymph nodes were extracted on day 8 after immunization and passed through a 70 μ m cell strainer (BD Biosciences). The cell suspension was treated with erythrocyte lysing solution (0.83% ammonium chloride) and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Cells were cultured *in vitro* for 2 days with 15 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ and 20ng/ml recombinant mouse IL-23 to favor the expansion of T_H17 cells. Cells were harvested, washed in phosphate-buffered saline (PBS), and injected i.p. into naive recipient mice (25 \times 10⁶ cells/mouse). Animals received 500ng of pertussis toxin i.p. at the time of transfer and 48 hours later.

Intracellular Cytokine Staining and Flow Cytometry

After 4–6 days of polarization, T_H cells of control subjects and MS patients were characterized for the expression of IL-17, IL-22 and IFN- γ by intracellular cytokine staining and flow cytometry, according to a previously published protocol.⁴ In brief, cells were stimulated for 6 hours with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20ng/ml) and ionomycin (1 μ g/ml) in the presence of brefeldin A (2 μ g/ml) (all from Sigma). Cells were first stained for the surface antigens lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1, CD3 (BD Biosciences) and CD45RO (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), then fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% saponin. Intracellular cytokine staining was performed using antibodies specific for human IL-17 (eBioscience), IL-22 (R&D Systems) and IFN- γ (BD Biosciences). Intracellular staining with antibodies raised against ROR γ t (clone AFKJS-9, eBioscience) and T-bet (clone 4B10, eBioscience) were also performed according to the manufacturer's protocol. Appropriate fluorochrome-matched isotype antibodies were used to determine nonspecific background staining. Samples were acquired on a BD Biosciences LSR II flow cytometer and analyzed using BD FACSDiva Software. In mice, spleen, lymph node, and CNS cells were labeled with surface markers CD4, CD3, CD44 and CD62L. Intracellular staining included antibodies specific for mouse IL-17 and IFN- γ (BD Biosciences). Flow cytometric analysis was conducted by gating on CD4⁺CD3⁺ cells.

BBB-EC Isolation and Culture

BBB-ECs were isolated from CNS tissue specimens of temporal lobe resections from young adults undergoing surgery for the treatment of intractable epilepsy, as previously described.²² Informed consent and ethical approval were given prior to surgery (ethical approval number HD04.046). Cultures expressed endothelial markers factor VIII, Ulex Agglutenens Europaensis-1 binding sites, and antigen HT-7 until passage 7–8. No immune reactivity with β -tubulin, α -myosin, or glial fibrillary acidic protein (GFAP) could be detected, confirming the absence of contaminating neurons, smooth muscle cells, and astrocytes.

Migration Assay

BBB-ECs grown in primary cultures were used to generate an *in vitro* model of the human BBB, as published previously.²² Migration assays were performed on a 24-well plate modified Boyden chamber. In brief, 3×10^4 human brain ECs were seeded on top of a gelatine-coated $3\mu\text{m}$ pore size membrane in EC culture medium supplemented with 40% (v/v) astrocyte-conditioned media, shown to induce and maintain BBB characteristics *in vitro*.²³ After 3 days of culture, the ECs had formed a confluent monolayer, as confirmed by haematoxylin–eosin staining. At that point, when applicable, ECs were treated with antibodies specific for ICAM-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, or mouse IgG1 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$, all from R&D Systems) for 1 hour prior to immune cell migration. A suspension of 1×10^6 T lymphocytes was loaded in the upper chamber. The ability of T_H17 lymphocyte subsets to cross the monolayer was assessed by counting the absolute number of cells that transmigrated to the lower chamber after 18 hours. All migration data shown represent at least 3 independent experiments performed in triplicate.

Immunofluorescent Staining for IL-17, Interferon- γ , ROR γ t and T-bet

Postmortem frozen brain sections from MS patients were fixed in -20°C acetone for 10 minutes, hydrated in PBS, and blocked with the avidin/biotin blocking kit (Invitrogen). Nonspecific immunoglobulin binding was blocked with 10% goat serum for 30 minutes at room temperature (rt). Sections were incubated for 40 minutes with mouse anti-IL-17 (1/50, R&D Systems) diluted in 3% goat serum and washed 7 times with PBS and 0.05% Tween 20 after each incubation. A goat anti-mouse Alexa 488 (1/300, Invitrogen) was incubated for 30 minutes at rt. Then, a mouse anti-IFN- γ biotinylated antibody (1/100, R&D Systems) was incubated overnight at 4°C , followed by a 30-minute incubation at rt with streptavidin-Cy3 (1/500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Sections were mounted using Gelvatol containing Hoechst 33258 pentahydrate ($10\mu\text{g}/\text{ml}$, Molecular Probes, Eugene, OR). Negative controls were performed omitting the primary antibody. Expression of transcription factors T-bet and ROR γ t was also assessed *in situ* in human CNS specimens and on T_H1 and T_H17 lymphocytes cultured *in vitro*. For that purpose, cytopspined T_H1 or T_H17 cells were permeabilized and fixed with cold acetone (for 10 minutes at -20°C) and immunostained with anti-T-bet (1/10) and anti-ROR γ t (1/20)

antibodies for 60 minutes at rt. Then, a goat anti-rat Cy3 antibody (1/200, Jackson ImmunoResearch) was added for 30 minutes at rt. Fluorescence was visualized on a Leica DM6000 B epifluorescent microscope equipped with a DFC480 digital camera (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) or on a Leica SP5 confocal microscope. Images were acquired using Openlab 4.0.4 (Improvision, Waltham, MA) and processed and analyzed with Adobe Photoshop CS2 (Adobe, Mountain View, CA). Colocalization studies of IL-17 and IFN- γ , as well as ROR γ t and T-bet, were done on images acquired with a Leica SP5 confocal microscope. The degree of colocalization was estimated in IL-17–IFN- γ double-positive cells with the Leica LAS AF software, where the overlap coefficient was calculated. One represents the maximum degree of colocalization, and zero indicates no colocalization.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using PRISM 4 Graphpad Software (San Diego, CA) and are given as the mean \pm the standard error of the mean. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by Bonferroni multiple comparison post-test for all experiments except for the *in vitro* cytokine profile comparison before and after migration across the BBB, which was done using 2-way ANOVA. Only p values <0.05 were considered significant. The data reported are either from 1 representative experiment of 3 independent experiments or pooled from 3–5 experiments.

Results

Human IL-17– and IL-22–expressing T_H17 Lymphocytes Can Be Expanded From a Pool of Memory CD4⁺CD45RO⁺ T Cells Upon Stimulation With IL-23

In mice, IL-23 was initially shown to promote the expansion of IL-17–producing CD4⁺ T cells, both *in vitro* and *in vivo*.^{12,24} Similarly, CD4⁺ T cells were isolated from the peripheral blood of healthy human donors and incubated with autologous CD14⁺ monocytes, in the presence of anti-CD3 antibody, rhIL-23, and neutralizing antibodies against IL-4 and IFN- γ . In these culture conditions, the vast majority of CD4⁺ T lymphocytes acquire a memory (CD45RO⁺) phenotype. After 4 days of culture, 22.0% of CD4⁺ T lymphocytes expressed IL-17, all of which were memory cells (Fig 1A, top panels). In comparison, only 5.5% of CD4⁺ T cells cultured with IL-12 and polarized to T_H1 produced IL-17.

Consistent with reports showing expression of IL-22 by T_H17 lymphocytes,^{25,26} we found that 9.7% of human healthy donor CD4⁺ T cells stimulated with IL-23 expressed both IL-17 and IL-22. In contrast, only 1.5% of CD4⁺ T cells polarized in the presence of IL-12 produced both IL-17 and IL-22 (Fig 1A, middle row panels).

Given that we could detect IL-17 expression predominantly in activated memory cells after IL-23 stimulation, we investigated whether human memory CD4⁺CD45RO⁺ T cells had an enhanced propensity to expand into a T_H17 population, when compared to bulk CD4⁺ T lymphocytes. Using CD4⁺CD45RO⁺ T cells of healthy subjects activated in the presence of IL-23, we were indeed able to enrich the pool of IL-17–producing cells up to 33.7%, compared with 22.0% when bulk CD4⁺ T cells were used (Fig 1A, top panels, n = 4). In the absence of exogenous cytokine stimulation, CD4⁺CD45RO⁺ T cells failed to produce significant amounts of IL-17 or IL-22 (Supplementary Fig 1A, left panels).

In our culture system, IL-17– or IL-22–expressing lymphocytes could not be expanded from human naive CD4⁺CD45RA⁺ T cells sorted and cultured in the presence of autologous monocytes, in response to IL-23 (Supplementary Fig 1B).

Surprisingly, even after 4–6 days in culture under these conditions, the majority of naive T cells remained CD45RA⁺.

In parallel with the intracellular cytokine production, we measured secretion of IL-17, IL-22, and IFN- γ in the supernatants of the T_H1- and T_H17-polarized human CD4⁺ or CD4⁺CD45RO⁺ T cells (Supplementary Fig 2A). As expected, without IL-23 stimulation, activated CD4⁺CD45RO⁺ T cells did not secrete significant amounts of IL-17 or IL-22. In the presence of IL-23, memory CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes secreted high levels of IL-17 and IL-22.

A Subpopulation of Human Memory CD4⁺CD45RO⁺ T Cells Concomitantly Expresses IL-17 and IFN- γ Upon Stimulation With IL-23

In addition to IL-17– and IL-22–producing lymphocytes, we also noted in the IL-23–driven T_H17 cultures the presence of cells coexpressing IL-17 and IFN- γ (Fig 1A, lower panels), a phenomenon rarely seen in mouse, at least not to this magnitude, but previously reported in the gut of patients with inflammatory bowel disease²⁷ and in coronary artery infiltrates.¹⁹ Notably, although a relatively high amount of T_H17-polarized cells expressed IFN- γ by intracellular cytokine staining (7.9% IL-17⁺ IFN- γ ⁺, Fig 1A), IFN- γ secretion by T_H17 cells remained low compared with T_H1-polarized cells (Supplementary Fig 2A). The proportion of CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes expressing IL-17, IL-22, IFN- γ , or a combination of these cytokines increased over time, at least until 6 days after IL-23 stimulation (Supplementary Fig 2B). Collectively, our data demonstrate that a subpopulation of human IL-17–expressing CD4⁺ T lymphocytes also produces IFN- γ . This unique population can be expanded from a subset of CD4⁺CD45RO⁺ T cells in response to IL-23 stimulation.

Increased Frequency of Lymphocytes Coexpressing IL-17 and IFN- γ in T_H17 Cell Lines of MS Patients

To establish the relevance and relative contribution of these T cell subsets in MS, we analyzed the intracellular expression of IL-17, IL-22, and IFN- γ in peripheral blood CD4⁺CD45RO⁺ memory T lymphocytes of MS patients and healthy donors by flow cytometry. Twelve female patients with clinically definite relapse–remitting MS (RRMS) were included in the study. Their main characteristics are summarized in

the Materials and Methods section. As in healthy controls, freshly isolated peripheral blood CD4⁺CD45RO⁺ memory T lymphocytes from MS patients did not express high levels of proinflammatory cytokines even following 6 hour activation with PMA and ionomycin. Both in MS and controls, IL-17–producing cells accounted for <2% of the total CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocyte population (data not shown). However, when memory T cells were stimulated *in vitro* for 6 days with IL-23 to induce a T_H17 profile, according to the protocol described above, we observed significant differences in the intracellular cytokine expression pattern between T_H17 cell lines of MS patients and those of age-matched controls. The percentages of IL-17⁺ (Fig 1B) and of IL-22⁺ (data not shown) lymphocytes, as well as the percentage of cells simultaneously expressing IL-17 and IL-22 (Fig 1C), were elevated in T_H17 cell lines derived from the blood of RRMS patients during a clinical exacerbation as compared with patients in remission and healthy individuals. Likewise, the frequency of CD4⁺ lymphocytes coexpressing IL-17 and IFN- γ was greatly increased in RRMS patients with active disease relative to controls (Fig 1D). Interestingly, although the overall production of IFN- γ increased in MS patients, the percentages of IFN- γ single producers were not significantly different between the control group and MS patients, whether in relapse or in remission (Fig 1E). Surprisingly, in men, no differences were observed in the cytokine expression profile between controls and MS patients (data not shown). The reason for this gender discrepancy is not clear at present, and could also be due to the relatively small sample size.

T_H17 Lymphocyte Migration Across the Human BBB is Mediated by ICAM-1

Leukocyte infiltration into the CNS is known to be an important event in the development of MS lesions.² In our previous study, we showed that T_H17 lymphocytes, like T_H1 cells, migrate efficiently across the BBB, and we reported an abundance of IL-17– and IL-22–expressing CD45RO⁺ memory T lymphocytes in highly infiltrated MS lesions.⁴ However, the exact adhesion molecules that direct the trafficking of T_H17 lymphocytes into the CNS remain largely unknown. ICAM-1 and VCAM-1, two members of the immunoglobulin superfamily expressed by the brain endothelium, are thought to participate in this highly regulated process. To address the specific contribution of these adhesion molecules to the T_H17 transmigration process, we performed an *in vitro* transendothelial migration assay, using primary

cultures of human BBB-ECs, in the presence of blocking antibodies to ICAM-1, and VCAM-1. The addition of anti-ICAM-1 antibody to human BBB-ECs led to a significant decrease in T_H17 migration across the endothelium ($p < 0.001$; $n = 6$), whereas no inhibition was observed in the presence of anti-VCAM-1 antibody, as compared with the isotype control (Fig 2A). The anti-VCAM-1 antibody was previously shown to be effective in blocking the migration of monocytes across the BBB in a similar migration assay system.⁷ Like T_H1 lymphocytes, the vast majority of T_H17 lymphocytes expressed LFA-1, the binding partner of ICAM-1 (Fig 2B). These results indicate that the transmigration of T_H17 lymphocytes across the human BBB is mediated mainly by ICAM-1, although the involvement of other adhesion molecules cannot be ruled out.

It is well established that the expression of several adhesion molecules is upregulated on the surface of ECs in response to inflammatory stimuli.^{28,29} We therefore sought to determine whether any of the proinflammatory cytokines produced by T_H17 lymphocytes could induce a change in the EC expression of ICAM-1, and in turn favor their recruitment into the CNS. Confluent monolayers of BBB-ECs were treated for 24 hours with IL-17, IL-22, or IFN- γ and the level of surface-expressed ICAM-1 was determined by flow cytometric analysis. A representative histogram is shown in figure 2C. Whereas both IL-17 and IL-22 failed to modulate the expression of ICAM-1 on the endothelium, exposure to IFN- γ induced a strong upregulation of the adhesion molecule on human BBB-ECs (from 38.8% in resting conditions to 71.8% upon activation with IFN- γ). Cotreatment of BBB-derived ECs with combinations of IL-17, IL-22, and IFN- γ , did not affect or potentiate the effect seen with IFN- γ alone (data not shown). Collectively, these data suggest that IFN- γ may play an instrumental role in facilitating the recruitment of T_H17 lymphocytes across the BBB by enhancing the local expression of ICAM-1, an effect that seems to be independent of IL-17 or IL-22.

IFN- γ -producing T_H17 Lymphocytes Migrate More Efficiently Across Human BBB-ECs

We next sought to determine whether the production of IFN- γ by T_H17 lymphocytes could influence their ability to migrate across the BBB, and would confer IL-17-IFN- γ double-producing cells an advantage over IL-17 single producers in the *in vitro* transmigration assay system. To do so, we compared the cytokine profile of T_H17-expanded cells before and after transendothelial migration, with respect to their IL-17 and IFN- γ expression. The subpopulation of T_H17 lymphocytes that concomitantly express IL-17 and IFN- γ was markedly enriched following migration across the human EC monolayer, doubling from 16.3% \pm 2.2% of the input cells to 33.3% \pm 2.6% of the transmigrated fraction ($p < 0.01$; Fig 2D). In contrast, the frequency of IL-17 single producers remained similar in the 2 fractions (14.9% \pm 2.2% before migration to 21.7% \pm 1.3% after migration, $p > 0.05$). Likewise, we did not observe a significant change in the percentage of single IFN- γ -expressing cells following transmigration across the human BBB. Together, these findings suggest that the subpopulation of T_H17 lymphocytes coproducing IL-17 and IFN- γ has an increased propensity to migrate across the brain endothelium and may display an advantage to be selectively recruited to sites of inflammation. Although unlikely, we cannot exclude the possibility that the brain endothelium induces the production of IL-17 or IFN- γ during the transmigration process.

IFN- γ -Secreting T_H17 Lymphocytes Are Recruited to the CNS of Mice During the Course of EAE

To confirm the *in vivo* significance of our findings, we elected to study the kinetics of T_H17 lymphocyte entry into the CNS by transferring IL-23-driven MOG-specific T_H17 lymphocytes into naive animals. For that purpose, C57BL/6 mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ were sacrificed during the presymptomatic phase of the disease. Spleen and inguinal lymph nodes were collected, dissociated, and cultured with MOG peptide in the presence of IL-23. In the initial *in vitro* IL-23-driven T_H17 cultures, 8.4% of the CD3⁺CD4⁺ T cells were IL-17⁺ and merely 1.9% coexpressed IL-17 and IFN- γ (data not shown). The *in vitro*-generated T_H17 lymphocyte cultures were reinjected into EAE C57BL/6 recipient animals, which were sacrificed at the onset of

disease (day 7–9, EAE score 0.5–1.0) or at the peak of disease (day 10–13, EAE score ≥ 2.5). As shown in figure 3A, we found that a significant proportion of IL-17–producing CD4⁺ T lymphocytes recovered from the CNS of recipient animals also coexpressed IFN- γ . The proportion of IFN- γ ⁺ IL-17⁺ CD4⁺ T cells in the CNS was markedly enriched as compared to the injected population (8.3% vs 1.9%), as well as to those found in the secondary lymphoid organs (Fig 3A). During early disease, we measured a 12-fold increase in the frequency of IFN- γ –IL-17 double producers in the CNS relative to IL-17 or IFN- γ single-producing cells (Fig 3B, $p < 0.05$). This specific CNS enrichment of IL-17⁺ IFN- γ ⁺ CD4 T cells was even more pronounced at the peak of disease, with a nearly 35-fold increase, (Fig 3B, $p < 0.01$).

Likewise, when EAE was induced in C57BL/6 animals by active immunization with MOG_{35–55}, we measured an increase of double-positive cells in the CNS, albeit only at the peak of disease (Fig 3C, 29-fold, $p < 0.05$). Together with the results obtained in the in vitro migration assay, these in vivo data confirm the preferential ability of IFN- γ –expressing T_H17 lymphocytes over IFN- γ [–] T_H17 cells to access the CNS compartment.

IFN- γ –expressing T_H17 Lymphocytes Are Present in Active MS Perivascular Infiltrates

We and others previously reported the presence of IL-17⁺ perivascular lymphocytes in active lesions of MS patients.^{4,14} Using our collection of frozen MS brains, we sought to evaluate whether IL-17–expressing lymphocytes were also immunopositive for IFN- γ within MS perivascular infiltrates. Histological examination (Luxol Fast Blue and hematoxylin–eosin staining) of 15–20 MS frozen tissue blocks revealed the presence of perivascular infiltrates within areas of limited demyelination (Fig 4A) in 8 blocks from 2 patients, suggestive of early lesion formation. In these samples, MS tissue infiltrates consisted mainly of CD3⁺ T cells (data not shown) but also comprised myelin debris, as depicted in the corner insets of Figure 4A. We found that a subpopulation of perivascular IL-17–expressing cells was also immunopositive for IFN- γ , in 12 out of 12 active lesions (Fig 4B, $n = 2$ patients). In our hands, most of the IL-17–expressing lymphocytes found within MS tissue were

immunopositive for IFN- γ , corroborating the findings by Annunziato et al. in human Crohn's disease.²⁷ In addition, IFN- γ -expressing T_H17 lymphocytes were detected in parenchymal tissue (Fig 4C), indicating that these T cells are not restricted to perivascular infiltrates.

The Transcriptional Regulators ROR γ t and T-bet Are Coexpressed in Subsets of T_H17 Lymphocytes In Vitro and In Situ.

ROR γ t and T-bet are well-known transcriptional regulators of the cytokine phenotype of lymphocytes. While ROR γ t is strongly associated with production of IL-17 and the T_H17 lineage,^{30,31} expression of T-bet controls IFN- γ production and defines the T_H1 phenotype.³² We thus elected to study the expression of these two transcriptional markers to validate our intracellular cytokine staining and *in situ* immunohistofluorescence findings. Human CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes were polarized for 3–5 days in the presence of IL-23 with autologous CD14⁺ monocytes, and T-bet was analyzed in cells expressing IFN- γ alone (Fig 5A, green gate), IL-17 alone (red gate), or both IFN- γ and IL-17 (black gate). We found that IFN- γ single-producing lymphocytes expressed higher levels of T-bet than IL-17-producing cells. Cells coproducing IL-17 and IFN- γ expressed similar levels of T-bet than IFN- γ single producers.

To evaluate whether ROR γ t and T-bet could be coexpressed in individual lymphocytes, we next performed cytopspin of human CD4⁺CD45RO⁺ T_H1 and T_H17 lymphocyte cultures followed by immunofluorescence staining and confocal microscopy. In T_H1 lymphocyte cultures, most cells were strongly immunoreactive for T-bet, whereas ROR γ t signal was rare (Fig 5B). Conversely, in T_H17 cultures, we detected ROR γ t⁺ and T-bet⁺ lymphocytes, as well as numerous T lymphocytes coexpressing T-bet and ROR γ t. Finally, we looked for the presence and number of lymphocytes coexpressing T-bet and ROR γ t within active MS lesions. We found cells expressing T-bet, ROR γ t, or both regulators of transcription in the perivascular space of active MS lesions (Fig 5C). T-bet- and ROR γ t-expressing cells were seen in equal proportion; 30% of the infiltrating lymphocytes coexpressed T-bet and ROR γ t (Fig 5C). Interestingly, whereas T-bet expression was found to be stable, we detected

variable levels of ROR γ t expression in individual lymphocytes (Fig 5C, arrowheads), suggesting that IL-17 regulation and T_H17 plasticity can probably occur within the human CNS.

Discussion

Both T_H1 and T_H17 lymphocytes have been implicated in the pathology of MS and EAE. Their postulated role in driving CNS inflammation has been ascribed essentially to IFN- γ and IL-17, the effector cytokines that respectively define these T-cell subsets. Originally, T_H1 lymphocytes were recognized as the major pathogenic population in MS and more particularly in EAE. But the discovery of the T_H17 lineage uncovered a pivotal role for IL-17–producing CD4⁺ T cells in mediating the disease in mice.^{33,34} Subsequent reports, including our own, extended these findings to humans by showing the presence of IL-17–expressing memory T cells in active MS lesions.^{4,7,14}

Unlike the T_H1–driving cytokine IL-12, IL-23 is said to be unequivocally required for the induction of EAE.¹² A positive correlation was also established in humans between levels of IL-23 and MS.³⁵ In apparent contrast, the precise role of the T_H17 effector cytokine IL-17 in the initiation of EAE and MS remains controversial. The observation that blockade of IL-17 only has a minor impact on the development of the disease in mice^{15,16} raises the possibility of additional effector cytokines, or combination of cytokines, being essential for the induction of the CNS inflammatory process. In the current study, we demonstrate that upon stimulation with IL-23, human peripheral blood CD4⁺CD45RO⁺ memory lymphocytes adopt a T_H17 phenotype characterized by the production of IL-17 and IL-22. We confirm that human memory CD4⁺CD45RO⁺ cells are more prone to expand into T_H17 lymphocytes as compared to naive CD4⁺CD45RA⁺ or unfractionated CD4⁺ T cells. We postulate that these peripheral blood memory lymphocytes probably enclose a larger pool of already predifferentiated T_H17 cells, as previously hypothesized by Stockinger.³⁶ More importantly, we detect in the IL-23–driven human T_H17 cell lines a small proportion of CD4⁺ lymphocytes expressing IFN- γ , with a subpopulation of cells simultaneously producing IL-17 and IFN- γ , despite the fact that cells were expanded in the presence of IFN- γ –neutralizing antibodies. We show that the proportion of IFN- γ ⁺ IL-17⁺ dual producers is significantly increased in MS patients in acute relapse but not during remission, and that these cells coexpress the transcription factors T-bet and ROR γ t, known to be required for IFN- γ and IL-17

production, respectively. Our data further suggest that these IFN- γ ⁺ IL-17⁺ double producers have an advantage over IL-17 or IFN- γ single-expressing cells to cross the BBB and access the CNS, both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, we demonstrate that these cells represent an important population of T lymphocytes within perivascular infiltrates in MS brain, supporting the biological relevance of IFN- γ -expressing T_H17 lymphocytes. The demonstration that ROR γ t and T-bet are also coexpressed *in situ* within individual cells in the perivascular space of MS lesions supports the pathological relevance of IFN- γ ⁺ T_H17 lymphocytes *in CNS* inflammatory events. Thus, our data expand and are consistent with the report by Annunziato *et al.* showing coexpression of IFN- γ and IL-17 by CD4⁺ T cells in the gut of patients with Crohn's disease,²⁷ and put forward a potential important role for IFN- γ ⁺ IL-17⁺ memory CD4⁺ T lymphocytes in the pathology of MS and the development of MS lesions.

The initial observation by Harrington *et al.*³⁷ and Park *et al.*³⁸ that IFN- γ impedes the differentiation of naive CD4⁺ T cells into T_H17 lymphocytes, and consequently inhibits IL-17 production, together with reports showing exacerbated EAE in IFN- γ -deficient mice,³⁹ has led many to question the proinflammatory role of IFN- γ in EAE. Yet, there is compelling evidence for the involvement of both the T_H1 and the T_H17 signature cytokines in the disease process. Kroenke *et al.* recently demonstrated that EAE can be induced by IL-12- or by IL-23-driven lymphocytes.¹⁷ Interestingly, in this study, IL-23-driven T_H17 lymphocytes were also shown to be immunopositive for IFN- γ , supporting the concept that IFN- γ might be required for the encephalitogenicity attributed to T_H17 cells.

Recent reports by Ivanov *et al.*, Eid *et al.*, and Boniface *et al.* show that IFN- γ and IL-17 are coexpressed in various target organs during the development of autoimmune experimental inflammation, including EAE.^{19,20,31} Studies by our group further support the relevance of these 2 cytokines to pathogenic processes occurring at the level of the BBB. IFN- γ modulates the expression of several adhesion molecules on the endothelium surface, while IL-17 contributes to breakdown of the BBB by disrupting tight junctions.^{4,21} But in spite of the extensive amount of studies investigating the specific roles of IFN- γ and IL-17 in CNS inflammation, only scarce

data are available regarding the possible collaborative interplay between these two cytokines, especially at the single-cell level. Here, we provide evidence that unlike IL-17 and IL-22, IFN- γ upregulates the expression of ICAM-1 on the surface of BBB-ECs. We further identify ICAM-1, but not VCAM-1 as an important adhesion molecule that controls T_H17 lymphocyte migration across the BBB. The ability of IFN- γ to induce expression of the adhesion molecule ICAM-1 on the brain endothelium may therefore positively affect the capacity of T_H17 lymphocytes to migrate across the BBB. Combined with the barrier disrupting effect conferred by IL-17 and IL-22,⁴ expression of IFN- γ by T_H17 lymphocytes thus represents an additional means by which T_H17 cells could promote their own recruitment to the CNS, as well as that of bystander leukocytes. As VCAM-1 blockade failed to impact on T_H17 migration, our data also suggest that the clinical efficacy of anti-very late antigen (VLA)-4 antibody Natalizumab (Tysabri) is dependent on the ability of VLA-4 to bind a yet unidentified ligand, in addition to VCAM-1.

Although it is difficult at this point to establish whether the concomitant production of IFN- γ and IL-17 by CD4⁺ lymphocytes represents a transitional stage of commitment of T_H17 cells, we demonstrate here that coexpression of IL-17 and IFN- γ confers a significant migratory advantage over IL-17 or IFN- γ single producers. In a recent report, Lee et al. put forward the concept of late developmental plasticity in the T_H17 lineage.¹⁸ In their study, they show that transforming growth factor (TGF)- β is required to sustain IL-17 expression. Conversely, the absence of TGF- β promotes IFN- γ production by CD4⁺ lymphocytes in an IL-23– and IL-12–dependent way. We thus speculate that following migration into the CNS, IL-17–IFN- γ double producers (possible “transitional” T_H17) found in the blood of relapsing MS patients could be influenced by the CNS environment, presumably through TGF- β , to fully differentiate into T_H17 cells. In this respect, we and others have recently shown that human and mouse CNS-derived ECs, astrocytes and, dendritic cells secrete TGF- β and promote a T_H17, rather than a T_H1 phenotype.⁷

Overall, our data underline the existence and regulation of IFN- γ –expressing T_H17 lymphocytes in MS. Our study further sheds light on the possible synergistic effect of these proinflammatory cytokines, especially in favoring the migration of

double-producing cells across the BBB. This particular subpopulation of cells, characterized by the simultaneous production of IL-17 and IFN- γ is preferentially recruited to the CNS mainly through the IFN- γ -inducible ICAM-1/LFA-1 adhesion pathway. Given that IL-23 is important for development of EAE and of IL-17⁺ IFN- γ ⁺ double producers, and that both T-bet and ROR γ t play a crucial role in CNS inflammation, we speculate that coexpression of ROR γ t, T-bet and IFN- γ by T_H17 lymphocytes could contribute to their pathogenic potential.

Acknowledgments

This study was supported by funding from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC). A.P. and N.A. are Research Scholars from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and hold the Donald Paty Career Development Award of the MSSC. H.K. holds a scholarship research award from the CIHR. J.I.A. holds a fellowship from the CIHR Strategic Training Initiative in Health Research Neuroinflammation Training Program and the MSSC.

We thank K. Kreyborg for helpful advice on the adoptive transfer protocol.

References

1. Weiner HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Arch Neurol.* 2004; 61:1613-1615
2. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:683-747
3. Burns J, Bartholomew B, Lobo S. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1999; 45:33-39
4. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007; 13:1173-1175
5. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M et al. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 1996; 6:259-274
6. Greter M, Heppner FL, Lemos MP et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005; 11:328-334
7. Ifergan I, Kebir H, Bernard M et al. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain.* 2008; 131:785-799
8. Friese MA, Jakobsen KB, Friis L et al. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat Med.* 2008; 14:1227-1235
9. Babbe H, Roers A, Waisman A et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 2000; 192:393-404

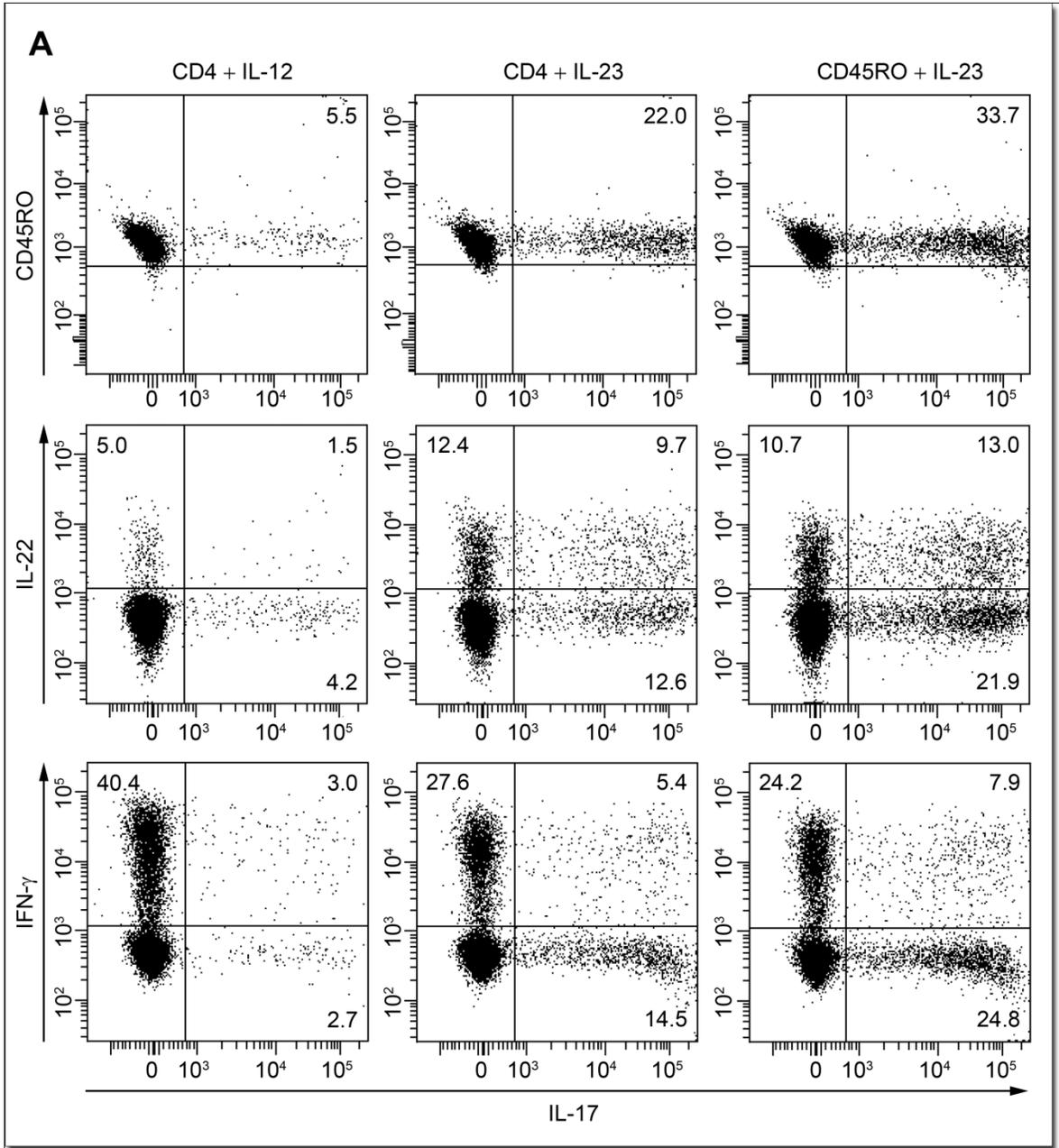
10. Renno T, Zeine R, Girard JM et al. Selective enrichment of Th1 CD45RB^{low} CD4⁺ T cells in autoimmune infiltrates in experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol*. 1994; 6:347-354
11. Merrill JE, Kono DH, Clayton J et al. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:574-578
12. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005; 201:233-240
13. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003; 421:744-748
14. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2008; 172:146-155
15. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006; 177:566-573
16. Haak S, Croxford AL, Kreymborg K et al. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119:61-69
17. Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV et al. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med*. 2008; 205:1535-1541
18. Lee YK, Turner H, Maynard CL et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 2009; 30:92-107

19. Eid RE, Rao DA, Zhou J et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2009; 119:1424-1432
20. Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y et al. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med*. 2009; 206:535-548
21. Cayrol R, Wosik K, Berard JL et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol*. 2008; 9:137-145
22. Biernacki K, Prat A, Blain M et al. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60:1127-1136
23. Prat A, Biernacki K, Wosik K et al. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*. 2001; 36:145-155
24. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006; 24:179-189
25. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006; 203:2271-2279
26. Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L et al. IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007; 179:8098-8104
27. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007; 204:1849-1861

28. Bo L, Peterson JW, Mork S et al. Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; 55:1060-1072
29. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005; 6:1182-1190
30. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*. 2008; 9:641-649
31. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006; 126:1121-1133
32. Lovett-Racke AE, Rocchini AE, Choy J et al. Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity*. 2004; 21:719-731
33. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*. 2006; 27:17-23
34. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*. 2006; 116:1218-1222
35. Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol*. 2006; 176:7768-7774
36. Stockinger B. Good for Goose, but not for Gander: IL-2 interferes with Th17 differentiation. *Immunity*. 2007; 26:278-279
37. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR et al. Interleukin 17-producing CD4(+) effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*. 2005; 6:1123-1132

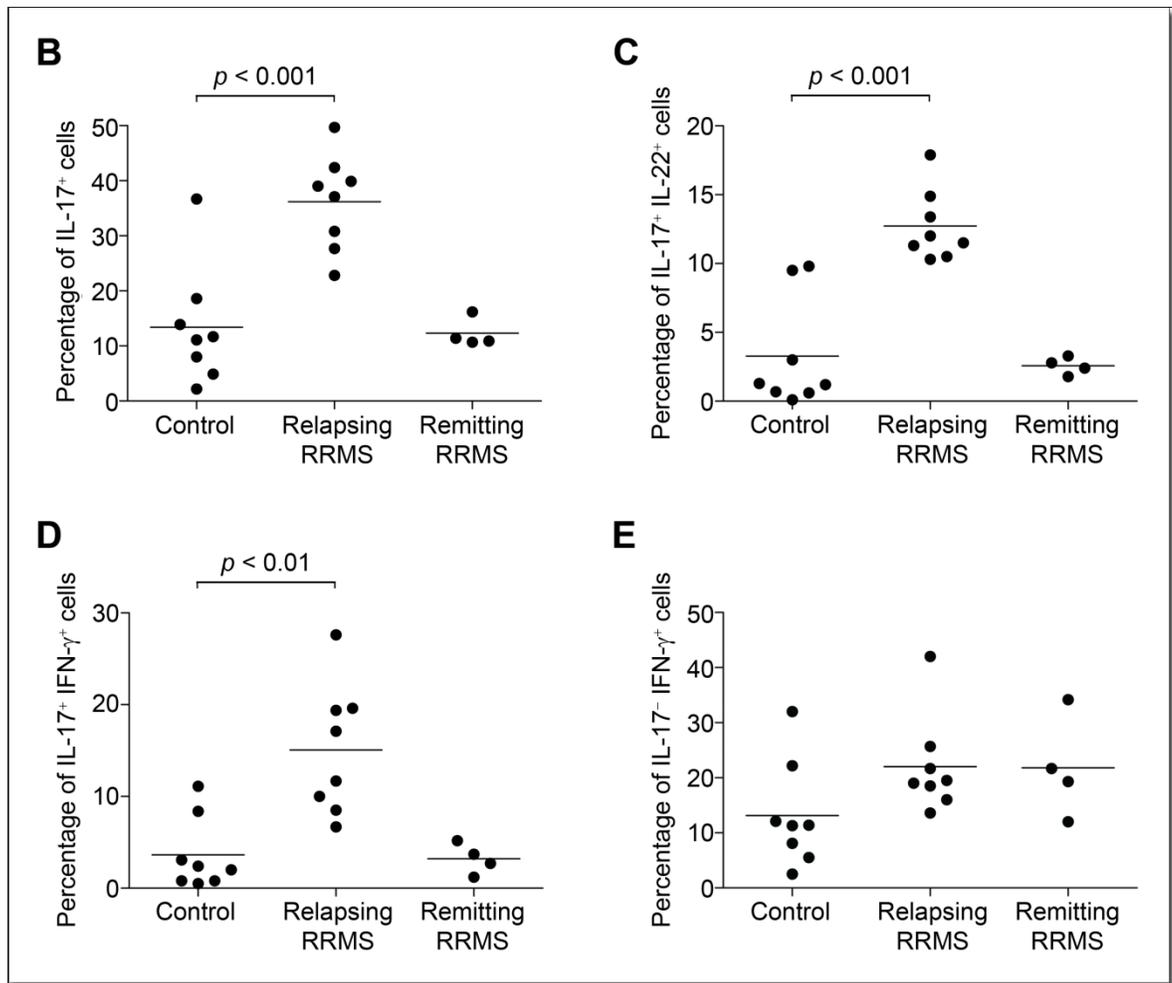
38. Park H, Li ZX, Yang XO et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*. 2005; 6:1133-1141
39. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*. 1996; 156:5-7

Figure 1 A



Kebir et al., Ann. Neurol. 66, 390 (2009)

Figure 1 B–E

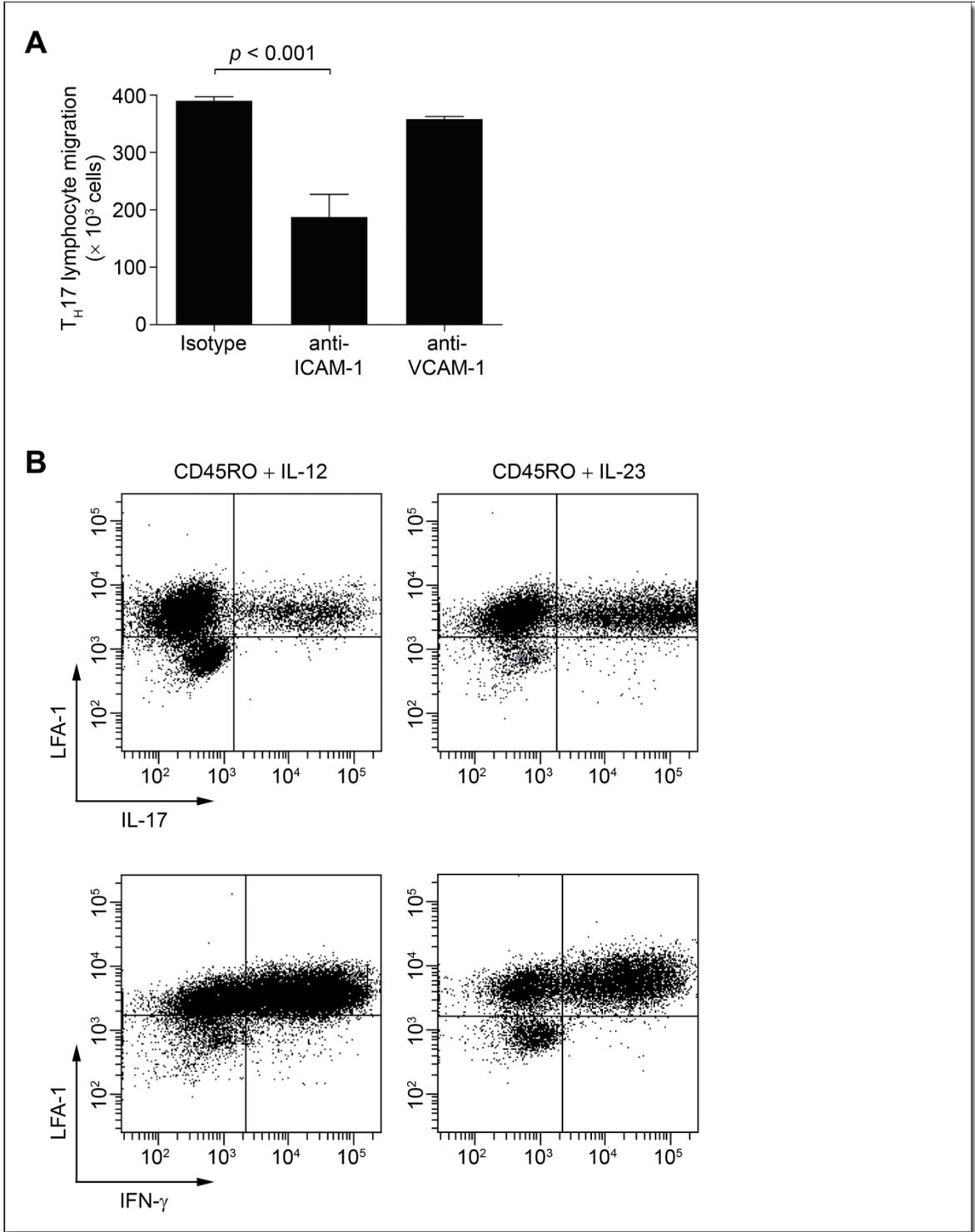


Kebir et al., *Ann. Neurol.* 66, 390 (2009)

Fig 1. Interferon (IFN)- γ is expressed by a subset of human CD4⁺ memory T lymphocytes in response to interleukin (IL)-23. (A) Human bulk CD4⁺ lymphocytes (left and central panels) or CD4⁺CD45RO⁺ memory lymphocytes (right panels) obtained from the peripheral blood of healthy donors were activated for 4–6 days with anti-CD3 antibodies in the presence of autologous CD14⁺ monocytes and either recombinant human IL-12 and anti-IL-4 antibodies (left panels) or recombinant human IL-23, anti-IL-4, and anti-IFN- γ antibodies (central and right panels). Cells were incubated for 6 hours in the presence of brefeldin A, phorbol 12-myristate 13-acetate, and ionomycin. Intracellular cytokine expression of IL-17 (all panels), IL-22 (center row), and IFN- γ (lower row) was assessed by flow cytometry,

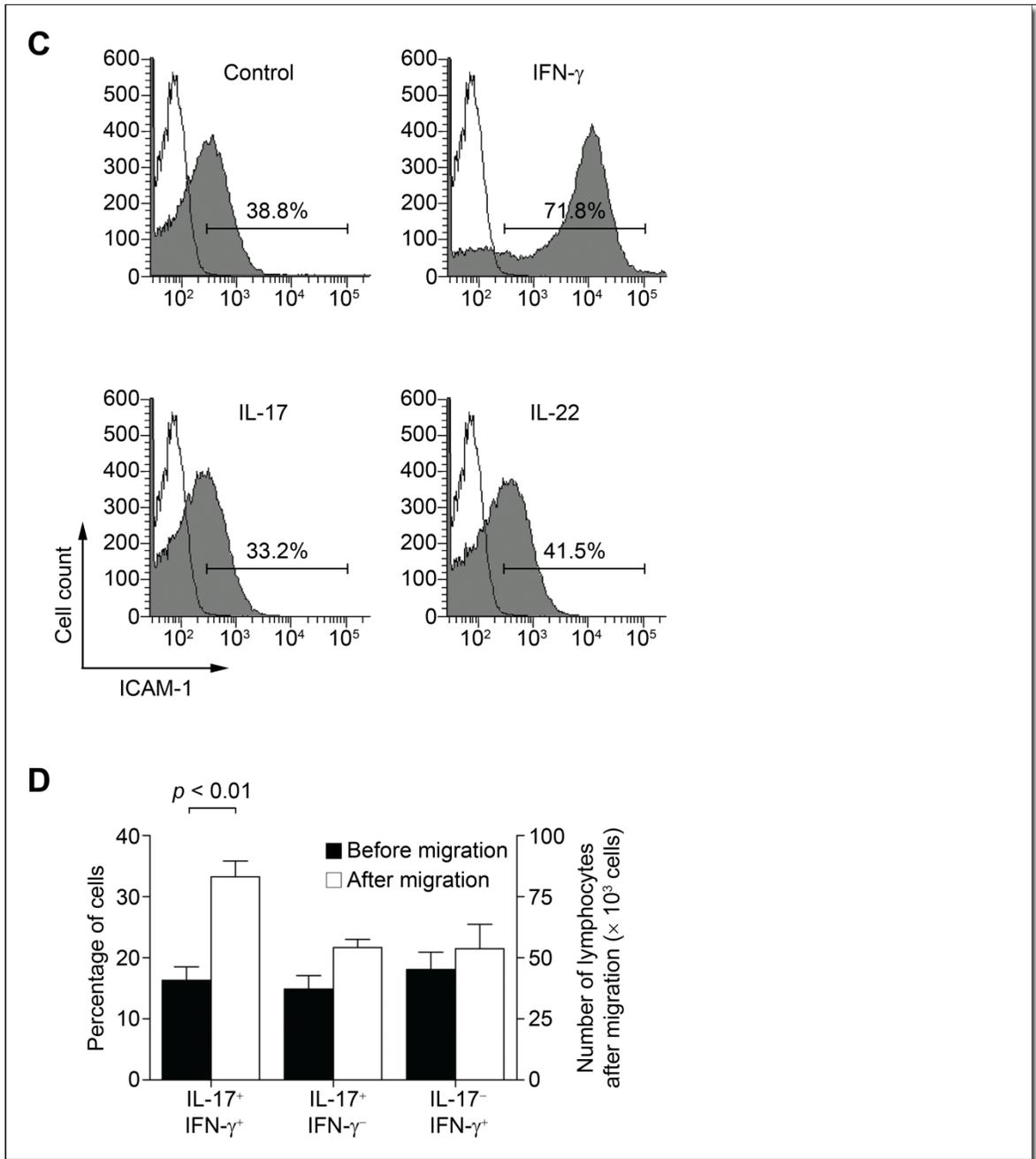
as described in the Materials and Methods section. Data shown are representative of $n = 8$ donors. (B–E) $CD4^+CD45RO^+$ lymphocytes isolated from the peripheral blood of 8 acutely relapsing multiple sclerosis (MS) patients, 4 nonrelapsing (stable) MS patients, and 8 age- and sex-matched control healthy donors were polarized for 4–6 days with recombinant human IL-23 to generate T_H17 lymphocytes. The percentage of lymphocytes expressing (B) IL-17, (C) both IL-17 and IL-22, and (D) both IL-17 and IFN- γ was found to be significantly elevated in patients during relapse, as compared with nonrelapsing patients and healthy donors. In contrast, the frequency of (E) IFN- γ^+ IL-17 $^-$ cells was not significantly different between the control group and MS patients. None of the patients had received immunomodulatory or corticosteroid therapy. Each dot represents a donor. RRMS = relapse–remitting MS.

Figure 2 A–B



Kebir et al., Ann. Neurol. 66, 390 (2009)

Figure 2 C–D

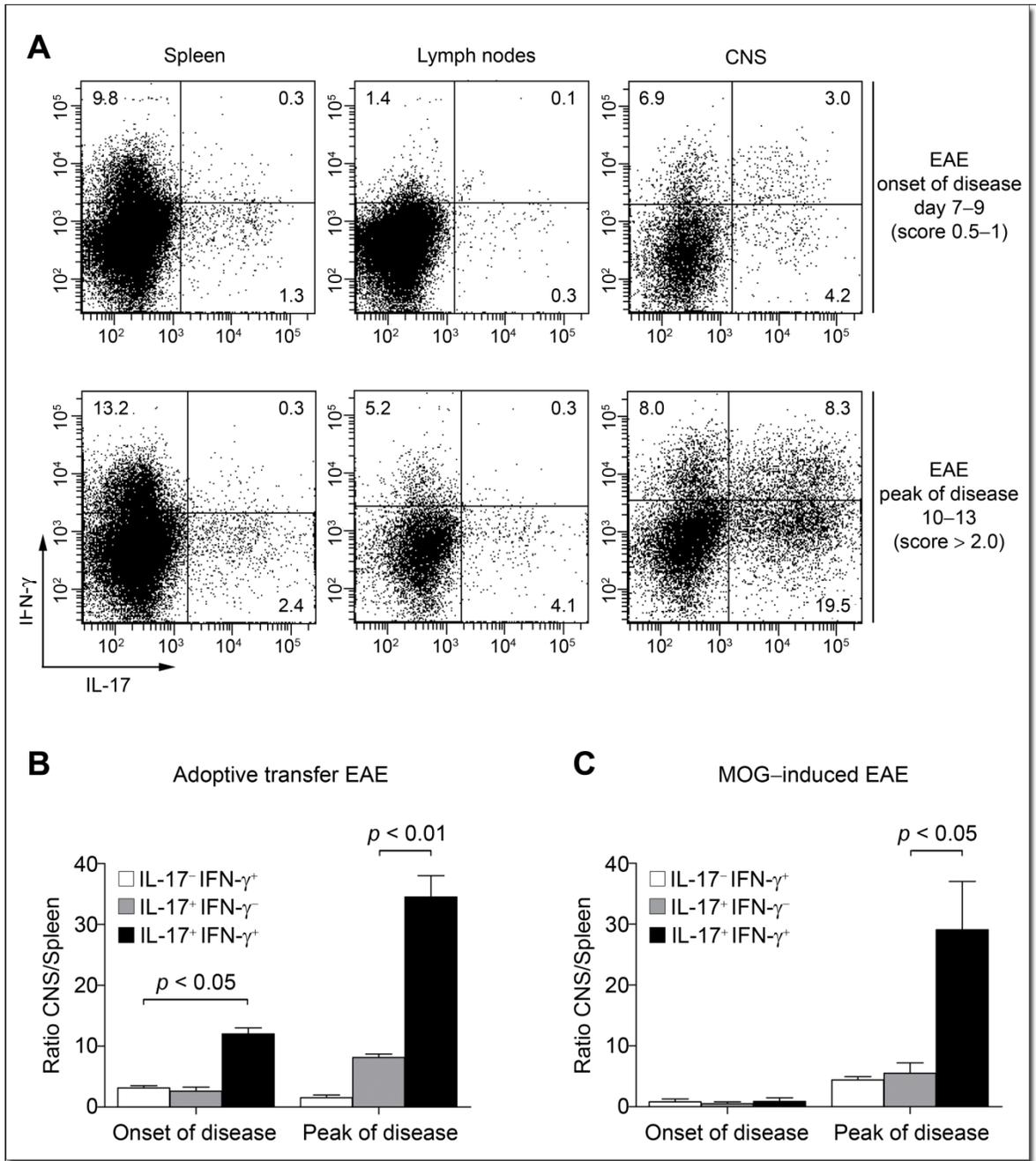


Kebir et al., *Ann. Neurol.* 66, 390 (2009)

Fig 2. Adhesion molecules involved in the recruitment of human T_H17 lymphocytes across the blood–brain barrier (BBB). $CD4^+CD45RO^+$ lymphocytes were isolated from the peripheral blood of healthy human donors and cultured for 4 days with autologous $CD14^+$ monocytes, anti-CD3, anti-interleukin (IL)-4, and anti-

interferon (IFN)- γ antibodies in the presence of IL-23 to generate T_H17 lymphocytes. (A) T_H17 lymphocytes (1×10^6) were allowed to migrate for 18 hours across a confluent monolayer of primary culture of human BBB endothelial cells (ECs) in a Boyden chamber migration assay, in the presence of blocking antibodies against intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 or vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1. The bar chart is representative of 5 independent experiments using 4 different BBB-EC preparations. (B) Intracellular cytokine expression of IL-17 and IFN- γ and surface expression of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 was assessed in human T_H1 or T_H17 lymphocytes by flow cytometry. Data are representative of $n = 6$ independent experiments. (C) Confluent monolayers of primary cultures of human BBB-ECs were treated with IFN- γ (100U/ml), IL-17 (100ng/ml); or IL-22 (100ng/ml) for 24 hours, and surface expression of the adhesion molecule ICAM-1 was assessed by flow cytometry. Data are representative of $n = 3$ independent experiments using 3 distinct BBB-EC preparations. (D) T_H17 lymphocytes (1×10^6) were allowed to migrate for 18 hours across confluent monolayers of primary cultures of human BBB-ECs in Boyden chamber migration assays. A total of 2.5×10^5 T_H17 cells migrated and were collected from the lower chamber. IFN- γ and IL-17 expression by T_H17 lymphocytes was assessed prior to (black bars) and following (white bars) migration. Data demonstrate a significant enrichment of IL-17⁺ IFN- γ ⁺ T_H17 lymphocytes on trans-BBB migration. The bar chart represents the mean \pm standard error of the mean (right axis) and percentage (left axis) of migrated and non-migrated cells. There were 3 independent experiments using 6 lymphocyte donors and 3 distinct BBB-EC cultures.

Figure 3

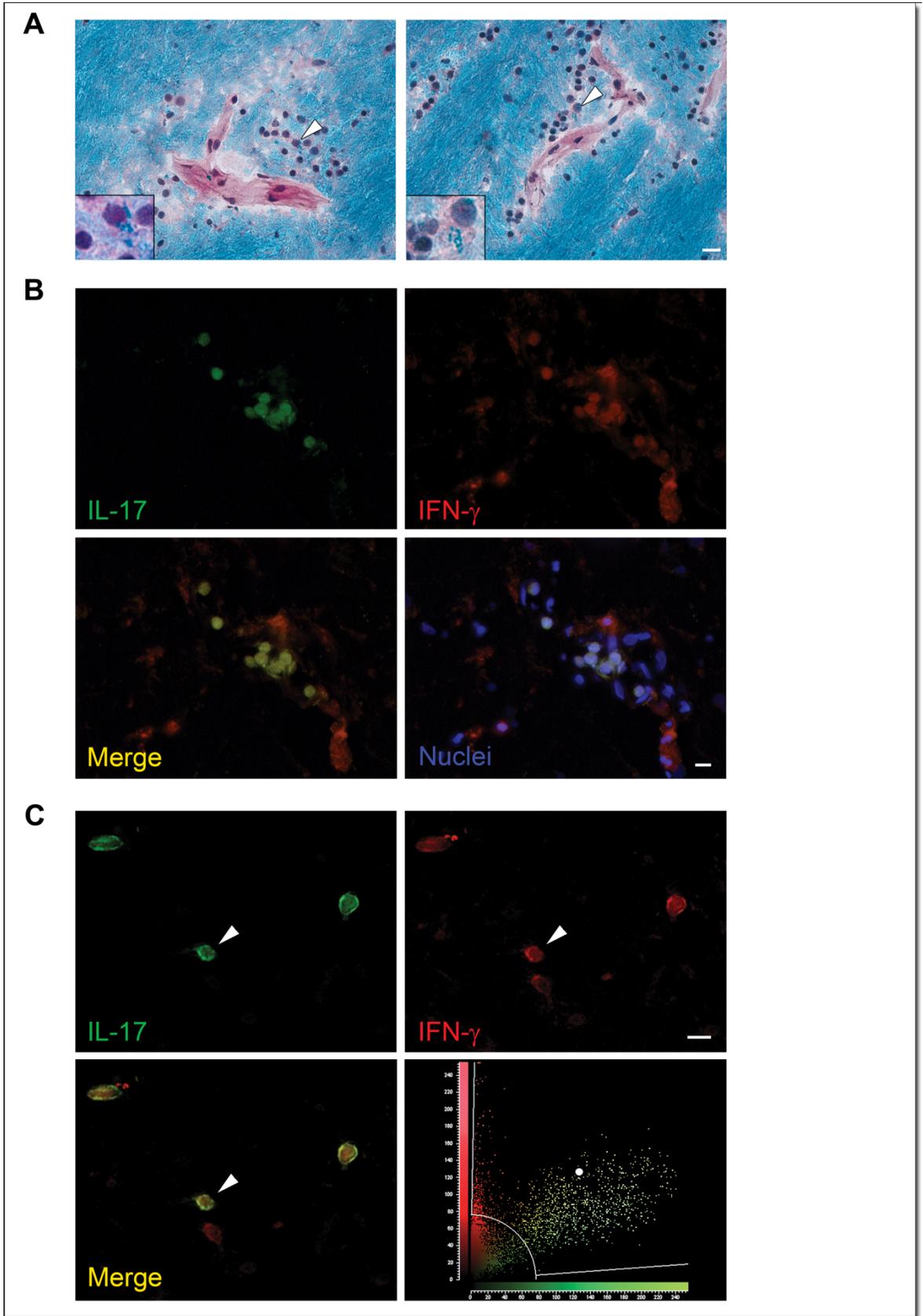


Kebir et al., *Ann. Neurol.* 66, 390 (2009)

Fig 3. Preferential recruitment of interferon (IFN)- γ -expressing T_H17 lymphocytes in the central nervous system (CNS) of C57BL/6 experimental allergic encephalomyelitis (EAE) mice. (A) Immune cells were isolated from the spleen and lymph nodes of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)_{35–55}-induced EAE animals at day 8 and restimulated in vitro for 48 hours with anti-CD3 and

recombinant mouse interleukin (IL)-23 to induce a T_H17 phenotype. T_H17 lymphocytes (25×10^6) were transferred intraperitoneally to naive C57BL/6 animals. Adoptively transferred EAE mice were sacrificed at the onset of symptoms (days 7–9, score 0.5–1.0, top panels) or at the peak of disease (days 10–13, EAE score ≥ 2.5 , bottom panels). IFN- γ and IL-17 expression by CD3⁺CD4⁺ lymphocytes recovered from the spleen (left panels), the inguinal lymph nodes (center panels), and the CNS (right panels) of recipient animals were assessed by flow cytometry. Data reveal a substantial enrichment of IFN- γ -expressing T_H17 lymphocytes in the CNS of EAE mice at the peak of the disease, as compared with the spleen or the lymph nodes of the same animals. Data are representative of 2 independent experiments with $n = 3$ animals per group. Dot plots were gated on CD3⁺CD4⁺ T cells. (B) EAE was induced by adoptive transfer of T_H17 lymphocytes as described above. Animals were sacrificed at the onset of symptoms (EAE score 0.5–1.0, days 7–9) or at the peak of disease (score ≥ 2.5 , days 10–13). IFN- γ and IL-17 expression by CD3⁺CD4⁺ lymphocytes recovered from the spleen and the CNS of recipient animals was assessed by flow cytometry. Data are presented as the ratio (CNS over spleen) of the absolute number of CD4⁺ T cells recovered from individual animals expressing IL-17⁻ IFN- γ ⁺ (white bars), IL-17⁺ IFN- γ ⁻ (grey bars), and IL-17⁺ IFN- γ ⁺ (black bars). Data demonstrate a significant enrichment of IFN- γ -expressing CD4⁺ T_H17 lymphocytes in the CNS of adoptively transferred EAE animals, as compared with IFN- γ ⁻ T_H17 lymphocytes, especially at the peak of disease. Bar chart represent the mean \pm standard error of the mean (SEM) from $n = 2$ independent experiments using 3 animals per group. (C) EAE was induced in C57BL/6 mice by active immunization with MOG_{35–55} peptide. Animals were sacrificed at the onset of symptoms (EAE score 0.5–1.0, days 10–12) or at the peak of disease (EAE score ≥ 2.5 , days 16–18). IFN- γ and IL-17 expression by CD3⁺CD4⁺ lymphocytes recovered from the spleen and the CNS was assessed by flow cytometry, as previously described. Again, data demonstrate that IFN- γ -expressing T_H17 lymphocytes accumulate specifically in the CNS and do so more than IFN- γ ⁻ T_H17 lymphocytes. Bar charts represent the mean \pm SEM from $n = 3$ independent experiments using 3 animals per group.

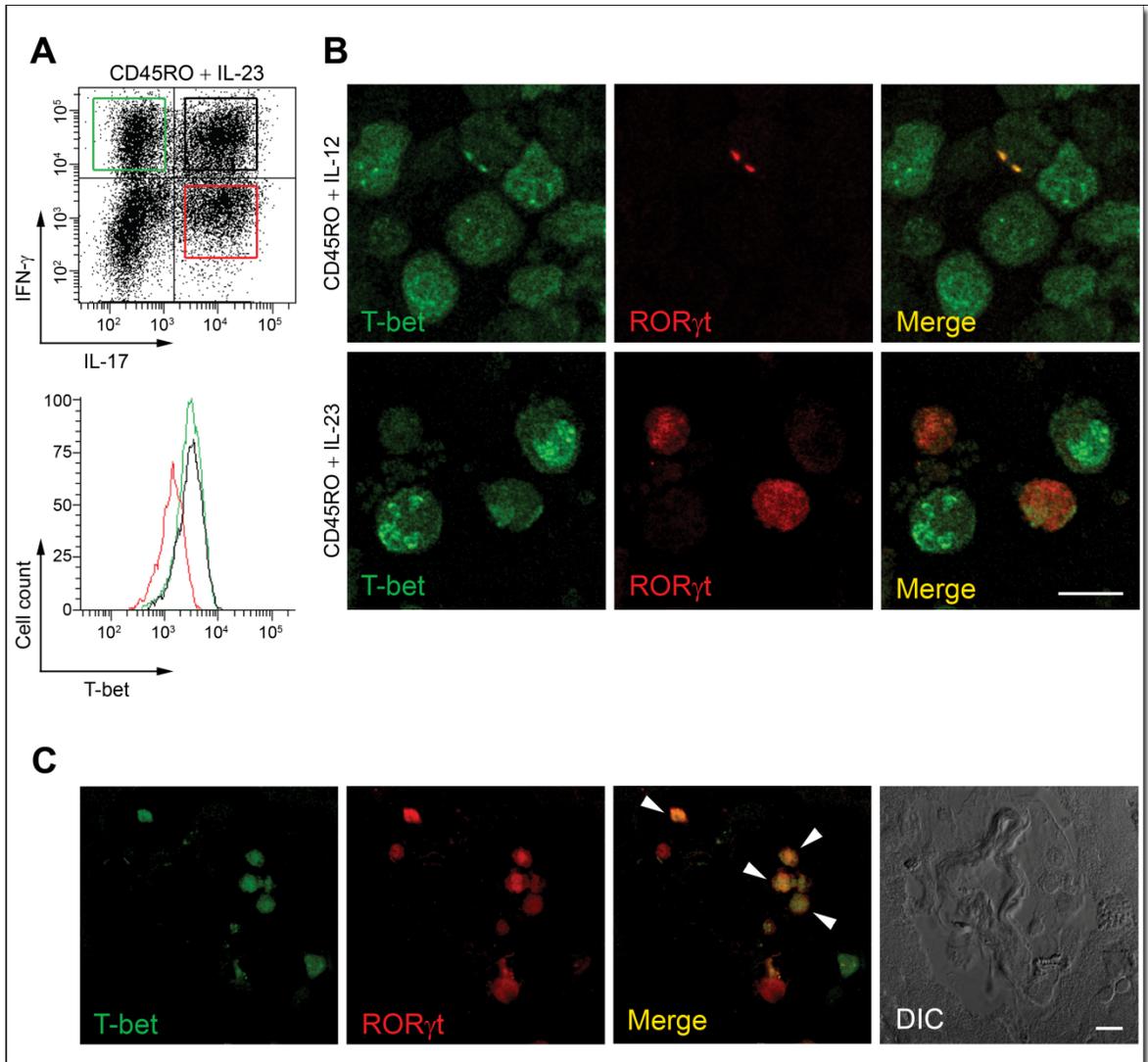
Figure 4



Kebir et al., *Ann. Neurol.* 66, 390 (2009)

Fig 4. Abundance of interferon (IFN)- γ -interleukin (IL)-17 coexpressing CD4 lymphocytes in active multiple sclerosis (MS) lesions. (A) Luxol Fast Blue and hematoxylin–eosin staining of frozen human central nervous system (CNS) postmortem material from MS-affected individuals. Corner insets display a higher magnification (2.5X) of the area indicated with the arrowhead and show myelin debris. Perivascular infiltrates are surrounded by a small area of demyelination, suggestive of early lesions. Scale bar: 20 μ m. (B) Human CNS postmortem frozen tissue from individuals affected by MS were immunostained for IL-17 (green), IFN- γ (red), and nuclear stain (Hoechst). Fluorescent microscopy revealed the presence of numerous cells coexpressing IFN- γ and IL-17 (merged image) in 12 of 12 active lesions from 2 distinct MS frozen brain specimens. Scale bar: 10 μ m. (C) Confocal microscopy confirmed coexpression of IL-17 (green) and IFN- γ (red) at the single cell level within MS tissues. The scatter graph in the bottom right panel shows the distribution of pixels for both fluorochromes, where high degree of colocalization is seen in pixels making up the cell indicated with the arrowhead (white dot). Colocalization analysis of cells coexpressing IL-17 and IFN- γ resulted in an overlap coefficient ranging from 0.9 to 1. Data shown are representative of $n = 20$ fields from 2 distinct MS brain specimens. Scale bar: 10 μ m.

Figure 5



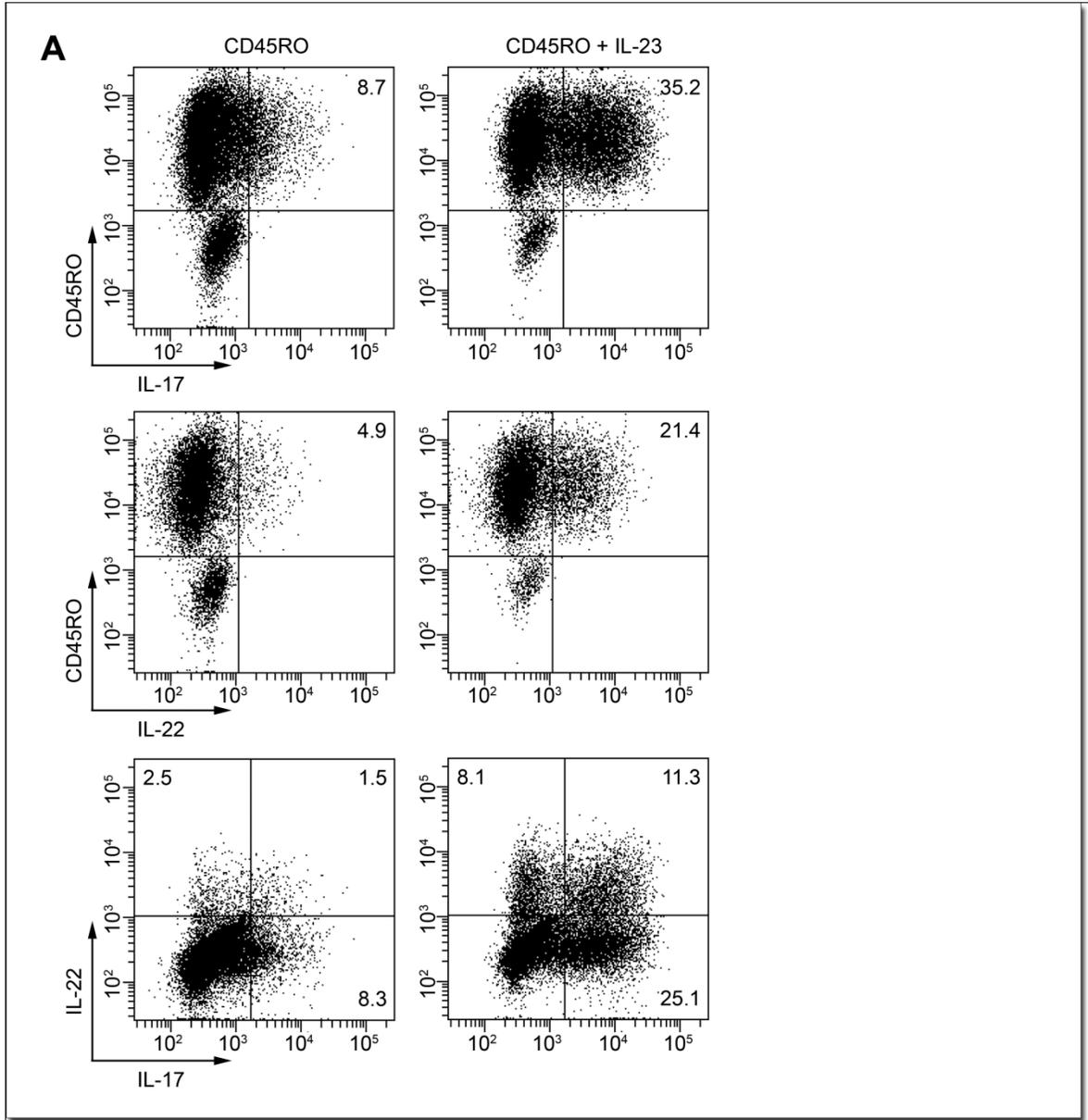
Kebir et al., *Ann. Neurol.* 66, 390 (2009)

Fig 5. Transcription factors $ROR\gamma t$ and $T-bet$ are coexpressed in a subpopulation of human T_H17 lymphocytes in vitro and in situ. Human bulk $CD4^+CD45RO^+$ memory lymphocytes obtained from the peripheral blood of a multiple sclerosis (MS) patient were activated for 4–6 days with anti-CD3 antibodies in the presence of autologous $CD14^+$ monocytes and either recombinant human interleukin (IL)-12 and anti-IL-4 antibody or recombinant human IL-23 with anti-IL-4 and anti-interferon (IFN)- γ antibodies. (A) Intracellular expression of IL-17 and IFN- γ (dot plot) was assessed by flow cytometry as described in the Materials and Methods

section. $CD45RO^+$ cells expressing only IL-17 (red gate), only IFN- γ (green gate), or both (black gate) were analyzed for expression of T-bet (histogram). Data shown are representative of $n = 4$ donors. (B) Human T_H1 (upper row) and T_H17 (lower row) lymphocytes, generated from healthy donors as described above, were cytopspined, fixed in acetone, and immunostained for ROR γ_t (red) and T-bet (green). Fluorescence was detected by confocal microscopy, and images were reconstructed in the right panels. Data shown are representative of $n = 4$ donors. (C) Human central nervous system postmortem frozen tissue from individuals affected by MS was immunostained for ROR γ_t (red) and T-bet (green). Confocal microscopy (with DIC/Nomarski) revealed the presence of cells expressing either ROR γ_t or T-bet, as well as infiltrating $CD4^+$ immune cells coexpressing ROR γ_t and T-bet (arrowheads). Data shown are representative of 12 active lesions from 4 distinct MS frozen brain specimens. Scale bar: $10\mu m$.

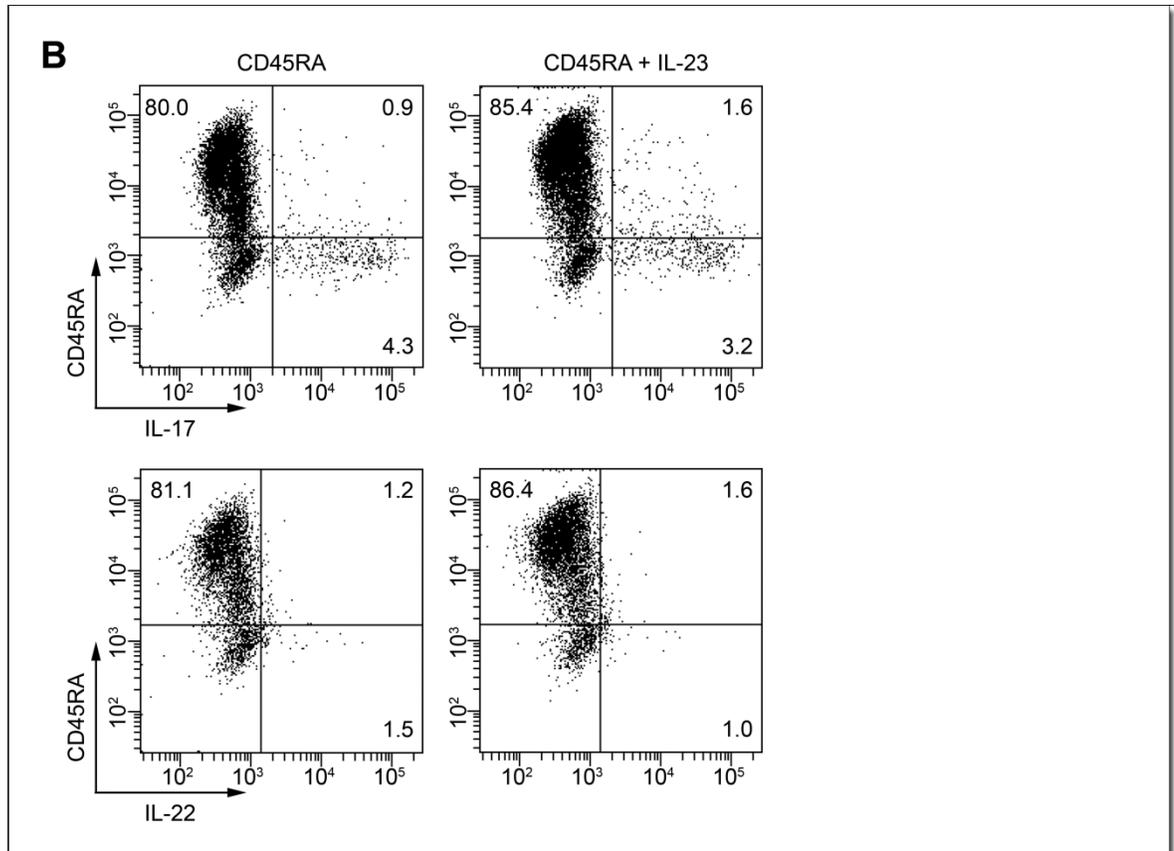
Supporting Information

Supplementary Figure 1 A



Kebir et al., Ann. Neurol. 66, 390 (2009)

Supplementary Figure 1 B

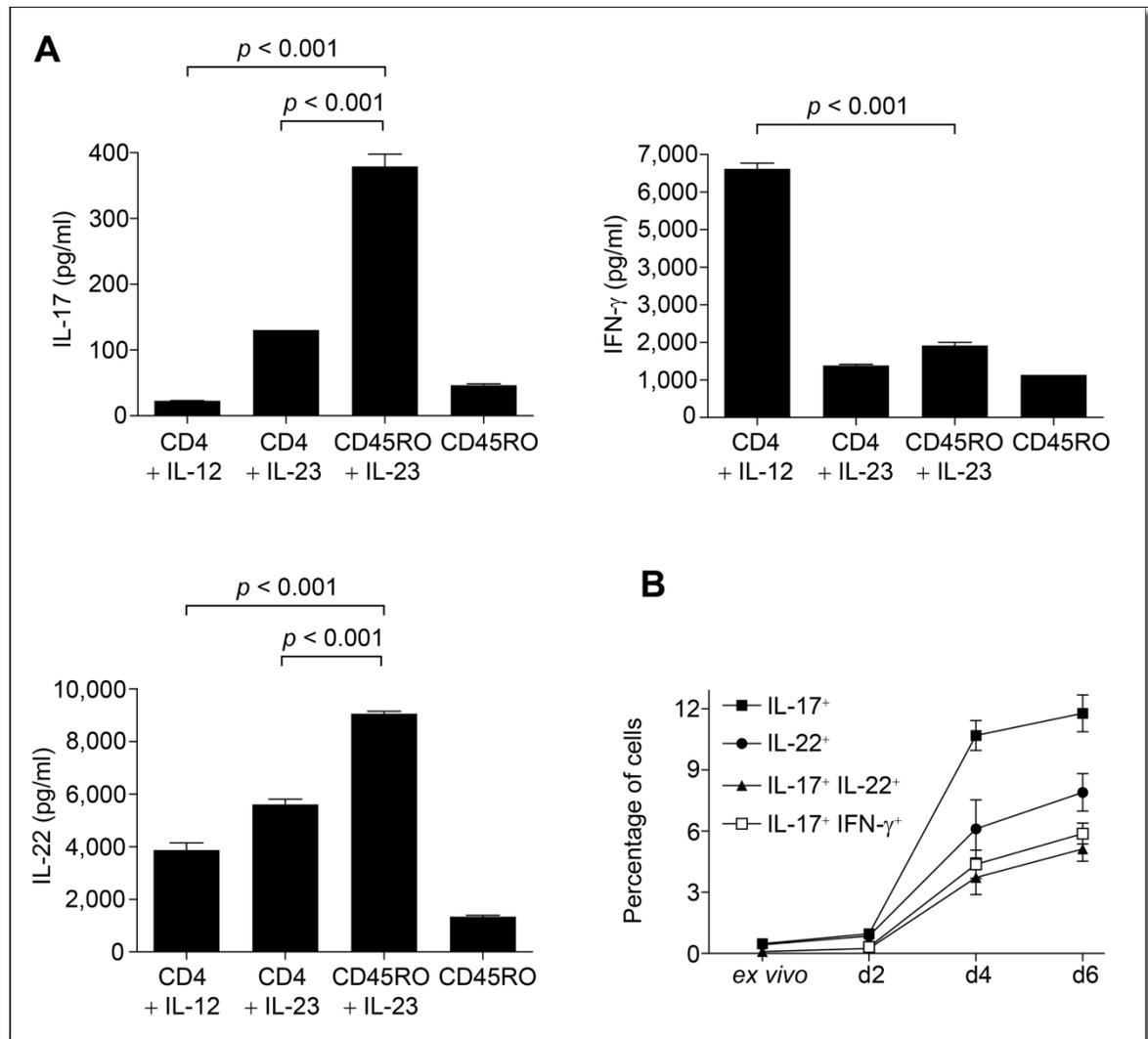


Kebir et al., *Ann. Neurol.* 66, 390 (2009)

Supplementary Fig 1. IL-23 promotes the expansion of IL-17⁺ and IL-22⁺ expressing lymphocytes from memory CD4⁺CD45RO⁺ but not from naive CD4⁺CD45RA⁺ cells. (A) Flow cytometric analysis of human CD4⁺CD45RO⁺ memory lymphocytes, isolated from the peripheral blood of healthy donors and cultured for 6 days with autologous CD14⁺ cells, in the presence of anti-CD3, anti-IL-4, anti-interferon (IFN)- γ antibodies without (left) or with (right) IL-23 stimulation. Cells were incubated for 6 hours with brefeldin A, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin and stained for CD45RO, IL-17, and IL-22. (B) Flow cytometric analysis of human CD4⁺CD45RA⁺ naive lymphocytes, isolated from the peripheral blood of healthy donors and cultured for 6 days with autologous CD14⁺ cells, in the presence of anti-CD3, anti-IL-4, and anti-IFN- γ antibodies without (left) or with (right) IL-23. Cells were incubated for 6 hours with brefeldin A, PMA and ionomycin and

stained for CD45RA, IL-17, and IL-22. Data shown are representative of 4 independent experiments.

Supplementary Figure 2



Kebir et al., *Ann. Neurol.* 66, 390 (2009)

Supplementary Fig 2. IL-23 promotes the expansion of T_H17 lymphocytes from human memory $CD4^+CD45RO^+$ lymphocytes. (A) Cytokine secretion by human T_H1 and T_H17 lymphocytes, expanded as described above and kept in culture for 4–6 days, was assessed by ELISA. Controls included $CD4^+CD45RO^+$ lymphocytes cultured for 4–6 days with autologous $CD14^+$ monocytes in the presence of anti- $CD3$, anti- $IL-4$, and anti- $IFN-\gamma$ antibodies, but in the absence of $IL-12$ or $IL-23$ stimulation. Bar charts represent the mean \pm the standard error of the mean (SEM) from 4 independent experiments. (B) Time-course of the intracellular cytokine expression by $IL-23$ -driven $CD4^+CD45RO^+$ lymphocytes. Peripheral blood

CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes from healthy donors were cultured with autologous CD14⁺ monocytes and supplemented with recombinant human IL-23, anti-IL-4, and anti-IFN- γ antibodies for 2, 4 and 6 days, analyzed for intracellular cytokine expression (IL-17, IL-22, and IFN- γ) by flow cytometry and compared to ex vivo cytokine expression. Symbols represent the mean \pm SEM from n = 7 different donors.

DISCUSSION

5. Contexte de l'étude

Bien que la physiopathologie de la SEP ne soit pas entièrement élucidée, il est clairement établi que les lymphocytes T CD4⁺ activés jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et la pérennisation de la réponse inflammatoire lors de cette affection. Cette notion provient notamment de l'étude anatomopathologique des plaques de SEP qui révèle une accumulation importante de lymphocytes T de type effecteur mémoire (exprimant le marqueur de surface CD45RO) au niveau des infiltrats péri-vasculaires des lésions actives de SEP (Bo et al., 2003; Burns et al., 1999; Rus et al., 2005). Les taux élevés de cytokines IFN- γ et TNF détectés au sein des lésions ainsi que dans le LCR recueilli lors d'épisodes de poussées de la maladie suggèrent par ailleurs une orientation préférentielle des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil pro-inflammatoire T_H1 (Lucchinetti et al., 2001; Navikas and Link, 1996). Plusieurs observations effectuées en parallèle dans le modèle animal expérimental d'EAE plaident aussi en faveur de l'implication des effecteurs T_H1 dans le développement de la maladie. Les clones de lymphocytes T_H1 auto-réactifs issus de souris immunisées contre un antigène de la myéline sont capables à eux seuls de déclencher l'apparition de symptômes neurologiques et d'induire la formation de lésions inflammatoires au SNC lorsque transférés à des animaux syngéniques (Baron et al., 1993). Qui plus est, les souris déficientes pour T-bet ou pour STAT-4, deux facteurs de transcription intervenant dans le programme de différenciation T_H1, ne développent pas d'EAE (Bettelli et al., 2004; Chitnis et al., 2001).

Si dès la fin des années 90, quelques études laissaient déjà entrevoir un rôle probable de l'IL-17 dans l'évolution de la SEP (Lock et al., 2002; Matusevicius et al., 1999), ce n'est qu'en 2005 que les lymphocytes T_H17 furent reconnus en tant que lignée à part entière (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Divers critères leur ont valu d'être classés comme sous-population lymphocytaire distincte de celle des T_H1 et T_H2. Premièrement, les lymphocytes T_H17 se caractérisent par un profil de sécrétion de cytokines particulier dont le chef de file est l'IL-17A. Ils produisent également de l'IL-17F et d'autres cytokines qui leur sont plus ou moins spécifiques comme l'IL-22, l'IL-21, le TNF et le GM-CSF (Petermann and Korn, 2011). Par

ailleurs, le facteur de transcription ROR γ t, qui s'est révélé être essentiel dans l'orientation du programme de différenciation des lymphocytes T naïfs vers un phénotype T_H17 (Ivanov et al., 2006), n'intervient pas directement dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ vers les profils T_H1 et T_H2. Enfin, le développement et l'expansion des lymphocytes T producteurs d'IL-17 semblent de prime abord indépendants des voies qui régulent la différenciation des autres lignées de lymphocytes T auxiliaires. De fait, plusieurs cytokines propres aux lymphocytes T_H1 (IFN- γ , IL-2) ou T_H2 (IL-4), de même que les facteurs de transcription qui contrôlent la différenciation de ces lignées (T-bet et GATA-3 respectivement) inhibent la production d'IL-17 (Jones et al., 2012; Mills, 2008).

En dépit de l'intérêt croissant à l'égard des T_H17, la nature de leur interaction avec l'endothélium cérébral et leur implication dans la physiopathologie de la SEP restait à éclaircir. Mon projet de thèse avait ainsi pour ambition de caractériser les lymphocytes T_H17 chez l'humain et définir leur contribution exacte dans la fragilisation de la BHE, une étape décisive dans la formation des lésions de SEP.

6. Expansion et caractérisation du profil cytokinique des lymphocytes T_H17 chez l'humain

Face à l'évolution rapide des connaissances sur le phénotype des lymphocytes T_H17 murins, peu d'équipes avaient jusque-là entrepris l'étude détaillée du profil cytokinique des lymphocytes T_H17 chez l'homme. Cependant, au-delà des acquis fondamentaux que fournit l'expérimentation animale, il importe de tenir compte des différences vraisemblables entre l'immunité humaine et murine. Celles-ci sont mises en évidence notamment dans la SEP par les échecs de certaines approches thérapeutiques bénéfiques en EAE (Mix et al., 2010). Nous nous étions donc fixés comme premier objectif de caractériser les lymphocytes T_H17 chez l'humain et d'identifier les facteurs qu'ils sécrètent susceptibles d'être impliqués dans la physiopathologie de la SEP. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode expérimentale permettant l'expansion *in vitro* de populations de lymphocytes T_H17 à partir de cellules mononuclées provenant du sang de donneurs sains. Puisque l'IL-17 est produite de manière prépondérante par des lymphocytes T mémoires et que seuls ces derniers expriment le récepteur de l'IL-23 (Parham et al., 2002), nous

avons d'emblée activé des cellules $CD4^+CD45RO^+$ (plutôt que des CD4 totaux) avec de l'anti-CD3 et des monocytes $CD14^+$ autologues en guise de cellules présentatrices d'antigène. Pour induire un profil T_H17 , nous avons stimulé les cellules pendant six jours avec de l'IL-23 en présence d'anti-IFN- γ et d'anti-IL-4. En effet, des études préalables menées par les groupes du Dr Dong et du Dr Weaver démontraient qu'afin de favoriser la production d'IL-17 par les lymphocytes T $CD4^+$, il s'avérait nécessaire de bloquer les voies de différenciation alternatives T_H1 et T_H2 au moyen d'anticorps dirigés respectivement contre l'IFN- γ et l'IL-4 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005).

Au bout de 4 jours de culture dans ces conditions, plus de 35% des cellules adoptent un phénotype T_H17 , comme l'atteste leur production d'IL-17 mesurée par ELISA (*Enzyme-linked immuno sorbent assay*) et par marquage intracellulaire (Kebir et al., 2009). En revanche, l'IL-23 ne semble pas permettre à elle seule la différenciation des lymphocytes naïfs $CD4^+CD45RA^+$ humains en T_H17 lorsque les cellules sont maintenues dans des conditions de culture identiques à celles décrites ci-dessus. À ce propos, plusieurs groupes rapportent que chez l'humain, la présence de faibles doses de TGF- β , en combinaison avec diverses cytokines, serait requise pour la différenciation des cellules naïves en T_H17 (Manel et al., 2008; Volpe et al., 2008; Yang et al., 2008a). Toutefois, l'importance du TGF- β comme facteur de différenciation des lymphocytes T_H17 est loin d'être consensuelle encore aujourd'hui. De récents travaux menés par l'équipe du Dr O'Shea démontrent que l'IL-23 favorise l'expression soutenue du récepteur de l'IL-23 par les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs murins stimulés avec l'IL-1 β et l'IL-6, et ce même en absence totale de TGF- β (Ghoreschi et al., 2010). Il convient de mentionner par ailleurs que dans le modèle expérimental d'EAE, les lymphocytes T_H17 générés au moyen du TGF- β et de l'IL-6 n'ont qu'un faible pouvoir pathogène. En effet, cette combinaison de cytokines favoriserait la production d'IL-10 par les lymphocytes T_H17 , ce qui limiterait en retour leurs propriétés encéphalogéniques. Une stimulation subséquente avec l'IL-23 serait nécessaire pour rétablir l'activité pathogène des effecteurs T_H17 (McGeachy et al., 2007). Les lymphocytes T $CD4^+$ qui produisent simultanément de l'IL-17 et de l'IL-10 ont récemment été impliqués dans les infections provoquées par la bactérie *Staphylococcus aureus* (Zielinski et al., 2012) mais un phénotype

semblable n'a jamais été décrit *in situ* dans le contexte de la SEP. Nous n'avons nous-mêmes jamais détecté l'expression d'IL-10 dans nos cultures de lymphocytes T humains stimulés avec l'IL-23 (données non publiées).

L'ensemble de ces données suggère qu'il existe sans doute diverses méthodes efficaces pour générer des lymphocytes producteurs d'IL-17, et vraisemblablement aussi pour polariser des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers les voies T_H1 ou T_H2. Les cytokines présentes dans le milieu au moment de la différenciation joueraient un rôle décisif sur le profil cytokinique des lymphocytes T effecteurs, ce qui expliquerait par ailleurs l'importante hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T auxiliaires. Reste toutefois à identifier les facteurs qui induisent l'expression du récepteur de l'IL-23 à la surface des lymphocytes T chez l'humain et permettent par le fait même d'orienter la polarisation de ces cellules vers la voie T_H17.

Outre la production d'IL-17, l'IL-23 induit également la sécrétion d'IL-22 par les lymphocytes T_H17 humains (Kebir et al., 2007), tel que rapporté précédemment chez la souris (Liang et al., 2006). L'IL-22 fait maintenant partie des cytokines « signatures » des lymphocytes T_H17, bien qu'elle soit également produite dans une moindre mesure par les lymphocytes polarisés vers la voie T_H1, les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Petermann and Korn, 2011; Sonnenberg et al., 2011). Deux études publiées en 2009 dans la revue *Nature Immunology* révèlent de surcroît l'existence d'une population de lymphocytes T appelés T_H22 qui sécrètent principalement de l'IL-22 mais se distinguent des lymphocytes T_H17 classiques par le fait qu'ils ne produisent que peu ou pas d'IL-17 (Duhon et al., 2009; Trifari et al., 2009). L'expression spécifique du récepteur de chimiokines CCR10 à la surface des lymphocytes T_H22 promouvrait leur migration vers les kératinocytes épidermiques, ce qui expliquerait le fait que ces lymphocytes soient généralement détectés dans les tissus cutanés (Trifari et al., 2009) et qu'il n'en ait que rarement été mention dans les études sur la SEP (Rolla et al., 2014).

Finalement, nos travaux démontrent que les lymphocytes T CD4⁺CD45RO⁺ humains stimulés avec l'IL-23 expriment des niveaux élevés de granzyme B et sont capables de détruire les cellules neuronales, vraisemblablement via la dégranulation de leurs composants lytiques (Kebir et al., 2007). Il aurait été intéressant de confirmer cette

hypothèse en évaluant lors d'un test de dégranulation, l'expression de la glycoprotéine CD107a/LAMP-1 (*Lysosomal-associated membrane protein-1*) présente de manière transitoire au niveau de la membrane plasmique lorsque la cellule effectrice libère son contenu lytique (Alter et al., 2004; Betts and Koup, 2004). Il aurait été pertinent par la suite de réaliser des expériences *in vitro* en présence d'un inhibiteur de granzyme B, comme le Z-AAD-CMK (Z-Ala-Ala-Asp Chloromethyl Ketone) (Otake et al., 1991), afin de s'assurer que l'activité cytotoxique des lymphocytes T_H17 est bel et bien attribuable à la relâche de cette enzyme protéolytique. Notons que peu de temps avant la parution de notre article, une autre étude faisait mention de la production de granzyme par les lymphocytes T_H17 humains quoique d'après les auteurs, les cellules productrices d'IL-17 possèderaient une activité cytotoxique réduite par rapport à celle des lymphocytes T_H1 (Annunziato et al., 2007). Il convient de souligner cependant que dans l'étude d'Annunziato, les lymphocytes T_H17 furent générés en absence d'IL-23. Finalement, des données publiées en 2006 par Devadas et collègues suggèrent que la sécrétion de granzyme B pourrait provoquer la mort induite par activation cellulaire (AICD de l'anglais *activation-induced cell death*) des lymphocytes T_H2 en fin de réponse immunitaire (Devadas et al., 2006). Une avenue intrigante à explorer serait de savoir si les effecteurs T_H17 sont aussi éliminés suivant un mécanisme semblable dépendant de la voie granzyme B.

6.1 Production concomitante d'IL-17 et d'IFN- γ par les lymphocytes T_H17 mémoires humains

Originellement, les lymphocytes T_H17 étaient caractérisés presque exclusivement sur la base de leur production d'IL-17. Il nous est vite apparu cependant que la majorité des lymphocytes T CD4⁺ qui se retrouvent au sein du SNC de souris EAE au pic de la maladie expriment à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- γ (Kebir et al., 2009). De la même manière, nous détectons systématiquement une population de cellules IL-17⁺IFN- γ ⁺ dans les cultures de lymphocytes T_H17 humains stimulés avec l'IL-23, et ce bien que la polarisation des cellules s'effectue en présence d'anticorps dirigés contre l'IFN- γ (Kebir et al., 2009). Ces données semblaient à priori aller à l'encontre du concept selon lequel l'expression de ces deux cytokines serait mutuellement

exclusive et contredisent la caractérisation initiale des lymphocytes T_H17 faite à partir de cellules murines (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). En revanche, un nombre croissant d'études fait état de la présence d'une telle population de lymphocytes T doubles positifs (IL-17⁺IFN- γ ⁺), particulièrement aux sites d'inflammation, tels le cerveau de souris après induction de l'EAE (Abromson-Leeman et al., 2009; Ivanov et al., 2006) et la muqueuse intestinale de patients souffrant de la maladie de Crohn (Annunziato et al., 2007). Nos travaux furent toutefois les premiers à mettre en évidence l'existence de ces cellules au niveau des infiltrats péri-vasculaires des lésions actives de SEP (Kebir et al., 2009).

Nous avons décidé d'étudier plus avant cette population particulière de lymphocytes capables de produire à la fois la cytokine « signature » des T_H1 et l'IL-17, spécifique aux T_H17. Nous cherchions à établir entre autres si les lymphocytes IL-17⁺IFN- γ ⁺ co-expriment les facteurs de transcription T-bet et RORC2, associés respectivement aux lymphocytes T_H1 et aux T_H17 et eux aussi considérés mutuellement exclusifs. Notre étude démontre effectivement qu'une proportion des cellules issues des cultures de lymphocytes T_H17 humains stimulés avec l'IL-23 se caractérise par l'expression conjointe de T-bet et RORC2. *In situ*, l'analyse immunohistologique de coupes de cerveaux prélevés post-mortem sur des patients atteints de SEP révèle aussi la présence de cellules exprimant simultanément T-bet et RORC2 au sein des infiltrats péri-vasculaires (Kebir et al., 2009). Peu de temps après la publication de notre article, les résultats obtenus par le groupe du Dr O'Shea sont venus corroborer nos observations. Dans un article paru en 2010 dans la revue *Nature*, Ghoreschi et collègues montrent qu'environ 25–60% des cellules ROR γ t⁺IL-17⁺CD4⁺ retrouvés dans le SNC de souris EAE sont également T-bet⁺ (Ghoreschi et al., 2010). En outre, les auteurs rapportent que la proportion de lymphocytes T_H17 qui co-expriment T-bet et ROR γ t au sein du SNC est significativement plus élevée que celle des lymphocytes T_H17 exprimant uniquement ROR γ t. Il est intéressant de noter que seuls les lymphocytes T_H17 dits « non-conventionnels », soit ceux générés en absence de TGF- β , sont en mesure d'exprimer T-bet et Hlx1, un autre facteur de transcription de la famille homéobox nécessaire au maintien de la sécrétion d'IFN- γ induite par T-bet. Les lymphocytes T_H17 « classiques » différenciés en présence de TGF- β se distinguent quant à eux par l'expression de c-Maf (Ghoreschi et al., 2010),

un régulateur de transcription qui optimise l'expression du gène de l'IL-4 et donc originellement associé au phénotype T_H2 (Kim et al., 1999). Depuis, c-Maf a été impliqué dans l'induction de l'expression d'IL-10 par les lymphocytes T_H17 (Xu et al., 2009) et a été identifié plus récemment comme un répresseur de l'IL-22 (Rutz et al., 2011).

6.2 Plasticité du phénotype T_H17

L'observation inattendue par divers groupes, incluant le nôtre, qu'une proportion importante de lymphocytes T co-exprime l'IL-17 et l'IFN- γ en conditions inflammatoires a réanimé le débat sur la stabilité du phénotype T_H17 (Annunziato et al., 2007; Ivanov et al., 2006; Kebir et al., 2009). Il fut montré que la polarisation des lymphocytes T_H17 n'était pas un processus définitif tel que proposé initialement (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005), mais que leur profil phénotypique pouvait facilement être redirigé vers une autre lignée en fonction des cytokines présentes dans l'environnement local. Ainsi, après plusieurs rondes de culture en présence d'IL-12, les lymphocytes T_H17 murins se mettent à exprimer de l'IFN- γ et perdent éventuellement la capacité de produire l'IL-17. L'expression de la chaîne β 2 du récepteur de l'IL-12 à la surface des lymphocytes T_H17 témoigne de la plasticité immunologique de ces cellules et de leur propension à être reprogrammées en lymphocytes de type T_H1. Toutefois, la présence de TGF- β dans le milieu de culture empêche la phénoconversion des lymphocytes T_H17 en T_H1 (Lee et al., 2009). Les lymphocytes T_H17 peuvent également évoluer vers un profil T_H2 en réponse à une stimulation avec l'IL-4, puisque cette cytokine exerce aussi un effet marqué dans la réorientation de la réponse immunitaire lorsque les cellules n'ont pas atteint un stade terminal de différenciation. Comme attendu, la conversion des lymphocytes T_H17 en T_H1 ou en T_H2 s'accompagne d'une augmentation de l'expression des facteurs de transcription signatures correspondants, soit T-bet et GATA-3 (Lee et al., 2009; Lexberg et al., 2008).

Le caractère malléable des lymphocytes T_H17 s'explique au niveau moléculaire par le statut épigénétique bivalent des promoteurs des gènes T-bet et GATA-3. En particulier, la méthylation des histones sur les résidus lysine semble être un déterminant majeur de la plasticité des lymphocytes T CD4⁺. Dans le cas des

lymphocytes T_H17 , des marques épigénétiques activatrices (la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone 3, H3K4me3) ou inhibitrices (la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone 3, H3K27me3) localisées au niveau des régions promotrices de T-bet et GATA-3 influent sur l'accessibilité et l'expression de ces gènes et dictent la reprogrammation des lymphocytes T_H17 vers un profil T_H1 ou T_H2 (Wei et al., 2009). Les lymphocytes T_H17 ne sont pas les seuls à exhiber une certaine flexibilité au niveau de leur phénotype (Beyer and Schultze, 2011; Nakayamada et al., 2012; O'Shea and Paul, 2010). Par contre, les divers sous-types de lymphocytes T différenciés ne possèdent pas tous le même degré de plasticité. L'état répressif des loci RORC et IL-17 des lymphocytes T_H1 et T_H2 empêche leur conversion ultérieure en T_H17 et rend compte de la plus grande stabilité de ces cellules (Wei et al., 2009).

Par ailleurs, l'étonnante plasticité des lymphocytes T_H17 a initié un débat conceptuel quant au bien-fondé de définir les lignées de lymphocytes T auxiliaires d'après les cytokines qu'ils produisent. Il apparaît de plus en plus évident que les divers sous-types de lymphocytes T effecteurs, en particulier les T_H17 , se caractérisent par une grande hétérogénéité au niveau de leur profil cytokinique. Celui-ci semble également pouvoir changer au cours du temps, au point où les lymphocytes T_H17 peuvent perdre la capacité de produire leur cytokine signature (Hirota et al., 2011). Ceci pourrait expliquer que la polarisation *in vitro* des lymphocytes T humains vers un profil T_H17 engendre souvent des cultures mixtes, longtemps considérées moins pures (O'Garra et al., 2008). À titre d'exemple, le pourcentage de cellules productrices d'IL-17 dans nos cultures de lymphocytes T stimulés avec l'IL-23 est généralement de l'ordre de 25–35%, alors qu'on y dénombre en moyenne 11% de lymphocytes IL-17⁺IFN- γ ⁺ et 25% d'IFN- γ simple producteurs (Kebir et al., 2009).

La caractérisation phénotypique des lymphocytes T_H17 s'est donc révélée beaucoup plus complexe qu'attendue en raison du caractère plastique de ces cellules. Il semblerait toutefois que cette plasticité ne se manifeste pas de la même manière en fonction du contexte inflammatoire, infectieux ou non, auquel l'hôte est confronté. Nos travaux ont largement contribué à documenter la plasticité des lymphocytes T_H17 dans la physiopathologie de la SEP et de son modèle animal (Kebir et al., 2009). Celle-ci se traduit par l'hétérogénéité des sous-populations de lymphocytes T_H17 identifiés au sein du SNC au cours de la pathologie inflammatoire, aussi bien

chez la souris que chez l'homme. Nos données montrent que le profil d'expression des lymphocytes T CD4⁺ qui peuplent le SNC au stade actif de la maladie est très diversifié et comprend des cellules IL-17⁺IFN- γ ⁻, des IL-17⁻IFN- γ ⁺, des IL-17⁺IFN- γ ⁺, des RORC2⁺Tbet⁻, des RORC2⁻Tbet⁺ et des RORC2⁺Tbet⁺ (Kebir et al., 2009). Cette remarquable plasticité des lymphocytes T_H17 a également été mise en évidence *in vivo* dans l'étude d'Hirota et collègues où les auteurs utilisent un modèle de souris exprimant un gène rapporteur de l'IL-17A qui permet de suivre le devenir des cellules productrices d'IL-17 (Hirota et al., 2011). Ils démontrent ainsi que dans le SNC de souris atteintes d'EAE, une proportion importante des cellules « ex-T_H17 », c'est-à-dire des lymphocytes ayant déjà exprimé de l'IL-17 à un moment donné, produisent éventuellement de l'IFN- γ . Ils vont jusqu'à affirmer que les lymphocytes T_H17, et non les T_H1, seraient la principale source d'IFN- γ dans la moelle épinière des souris atteintes d'EAE. Ils concluent finalement que les lymphocytes IL-17⁺IFN- γ ⁺ proviennent de la lignée T_H17 et non T_H1, puisqu'on dénombre un pourcentage nettement réduit de ces cellules chez les souris déficientes pour l'IL-23p19 (Hirota et al., 2011; McGeachy et al., 2009). Les données de Ghoreschi *et al.* et celles d'Hirota *et al.* sont donc à rapprocher de nos propres travaux montrant que l'IL-23 favorise l'émergence de lymphocytes T CD4⁺ humains qui co-expriment l'IL-17 et l'IFN- γ .

Au contraire, dans un modèle de candidose cutanée aiguë, les lymphocytes T_H17 n'affichent pas de plasticité phénotypique et leur profil cytokinique ne dévie que rarement vers la production d'IFN- γ (Hirota et al., 2011). On soupçonne que le degré de plasticité des lymphocytes T_H17 soit grandement influencé par les signaux environnementaux que les cellules perçoivent. Cette souplesse considérable dont fait preuve le système immunitaire permettrait sans doute la mise en place d'une réponse rapide, appropriée et adaptée aux différents défis immunitaires auquel l'individu fait face.

Le destin des lymphocytes T_H17 et la stabilité de leur phénotype sont façonnés en grande partie par le microenvironnement cytokinique local dans lequel se trouvent les cellules. Les études de Lee *et al.* (Lee et al., 2009) et d'Hirota et collègues (Hirota et al., 2011) mettent en avant le rôle primordial de l'IL-23 dans la conversion des

lymphocytes T_{H17} en T_{H1} , ce qui contribuerait à expliquer que la pathogénicité des maladies inflammatoires chroniques, surtout celles impliquant un dérèglement de l'axe IL-23, soient souvent associées avec une forte plasticité des lymphocytes T_{H17} et avec la présence, aux sites d'inflammation, de cellules T mémoires possédant un phénotype intermédiaire entre les lignées T_{H1} et T_{H17} (Annunziato et al., 2007; Bending et al., 2009; Kebir et al., 2009; Nistala et al., 2010). Par ailleurs, il est probable qu'au cours des maladies inflammatoires chroniques, la plasticité des lymphocytes T_{H17} évolue également dans le temps, au gré des perturbations du microenvironnement cytokinique.

6.3 Phénotype des lymphocytes T_{H17} des patientes atteintes de sclérose en plaques

Nous avons initié, avec la collaboration du Dr Pierre Duquette et la clinique de SEP de l'Hôpital Notre-Dame, une étude visant à établir si les lymphocytes T_{H17} générés à partir du sang de patients atteints de SEP se distinguent de ceux de sujets contrôles quant à leur production intracellulaire d'IL-17, d'IL-22, d'IFN- γ et leurs marqueurs de surface (notamment les ligands des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1). Nous n'avons noté aucune différence dans le profil phénotypique des lymphocytes T $CD4^+$ fraîchement isolés (« *ex vivo* »), qu'ils proviennent du sang de patients ou de donneurs sains. Par contre, lorsque ces cellules T sont activées *in vitro* et polarisées en T_{H17} suivant le protocole décrit plus haut, la fréquence des lymphocytes T $CD4^+ IL17^+$, des $IL-22^+$ et des doubles positifs $IL-17^+IFN-\gamma^+$ est significativement plus élevée dans les lignées de lymphocytes T_{H17} provenant de patientes en poussée que dans celles de contrôles (également toutes des femmes) (Kebir et al., 2009). Des résultats similaires se dégagent de l'étude de Brucklacher-Waldert et collègues, qui ne montrent pas d'élévation dans le pourcentage de lymphocytes T $CD4^+$ producteurs d'IL-17 au niveau sanguin chez les patients atteints de SEP par rapport à des sujets atteints d'une maladie neurologique non-inflammatoire (Brucklacher-Waldert et al., 2009). Les auteurs rapportent néanmoins une production accrue d'IL-17 par les lymphocytes T recueillis dans le LCR des individus souffrant d'une affection neurologique inflammatoire. Qui plus est, chez les patients diagnostiqués avec la forme cyclique de SEP, des taux importants d'IL-17

sont détectés dans le LCR uniquement durant les poussées aiguës mais pas lors des phases de quiescence de la maladie. Les résultats de Brucklacher-Waldert *et al.* rejoignent parfaitement les données que nous obtenons à partir des cultures de lymphocytes T_H17 humains.

D'autres groupes observent pour leur part une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes T producteurs d'IL-17, d'IL-22 ou de cellules doubles positives IL-17⁺IFN- γ ⁺ dans le sang de patients présentant une SEP active par rapport aux sujets sains ou aux malades en phase de rémission (Durelli *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011). La divergence des résultats obtenus pourrait être attribuable, du moins en partie, à l'hétérogénéité des cohortes de patients recrutés d'une étude à l'autre. En effet, la durée moyenne de la maladie chez les sujets inclus dans l'étude de Brucklacher-Waldert *et al.* était de 3 ans et demi, alors que les études de Li *et al.* et Durelli et collègues portaient sur des patients diagnostiqués depuis moins de 16 mois. On peut supposer que les acteurs immunitaires impliqués aux stades précoces de la SEP soient différents de ceux qui dominent les phases plus tardives de la maladie. Ainsi, le pourcentage de lymphocytes T circulants producteurs d'IL-17 pourrait changer au cours du temps, en fonction de l'évolution de la SEP. Au vu des connaissances acquises sur la plasticité des lymphocytes T_H17, il paraît envisageable que l'IL-17 soit davantage impliquée lors des phases précoces de la maladie. Cette hypothèse a d'ailleurs été suggérée en 2008 par les groupes des Drs. Batocchi et Calabresi, qui dénotent une hausse de la production d'IL-17 chez les patients présentant un SCI (Frisullo *et al.*, 2008; Graber *et al.*, 2008), correspondant au premier épisode lésionnel d'origine inflammatoire évocateur de la SEP. Un point de vue similaire a été mis de l'avant pour expliquer l'échec des thérapies ciblant l'axe IL-23/T_H17 dans les études précliniques sur la SEP (Longbrake and Racke, 2009).

Soulignons finalement que les lignées T_H17 des femmes atteintes de SEP affichent un pourcentage de cellules IL-17⁺, IL-22⁺ et IL-17⁺IFN- γ ⁺ supérieur par rapport aux T_H17 des patients de sexe masculin (données non publiées). Il serait intéressant d'établir s'il existe un parallèle entre la forme de la SEP (cyclique versus progressive) et le profil des T_H17, surtout compte tenu du fait que la maladie se présente souvent

sous sa forme progressive primaire chez les hommes et sous sa forme cyclique chez les femmes.

7. Fragilisation de la barrière hémato-encéphalique par les lymphocytes T_H17

La fragilisation de la BHE et l'altération de ses propriétés de perméabilité constituent des étapes cruciales dans le développement de plusieurs pathologies cérébrales, dont la SEP (Kirk et al., 2003; Plumb et al., 2002; Vos et al., 2005). Afin de déterminer si les lymphocytes T_H17, par le biais des cytokines qu'ils produisent, peuvent induire un changement des propriétés de l'endothélium cérébral, nous avons en premier lieu analysé l'expression des récepteurs de l'IL-17 et de l'IL-22 sur les cellules endothéliales de la BHE.

7.1 Expression des récepteurs de l'IL-17 et de l'IL-22 par l'endothélium vasculaire cérébral

Nos analyses de cytométrie en flux indiquent qu'une sous-population de cellules endothéliales en culture primaire exprime l'IL-17R (23% des cellules) et l'IL-22R (16% des cellules) à l'état basal. *In situ* cependant, nous ne décelons pas ces deux récepteurs dans des coupes de cerveaux contrôles. L'IL-17R et l'IL-22R sont toutefois fortement exprimés dans le cerveau de patients atteints de SEP. L'expression des récepteurs de l'IL-17 et de l'IL-22 est localisée essentiellement au niveau de l'endothélium microvasculaire cérébral, identifié grâce au marqueur caveolin-1 (Kebir et al., 2007).

Les voies de signalisation induites suite à l'activation des récepteurs de l'IL-17 et de l'IL-22 ont été partiellement élucidées. La fixation de l'IL-17 sur son récepteur déclenche une voie de signalisation intracellulaire qui fait intervenir la molécule adaptatrice Act-1 (*Actin-related gene 1*) (Chang et al., 2006; Qian et al., 2007). Celle-ci permet le recrutement de TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*) qui, en interagissant directement avec le domaine cytoplasmique de la sous-unité IL-17RA, induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) et de la voie de signalisation des MAP (*Mitogen activated protein*) kinases (Schwandner et al., 2000). Toutefois, une étude parue en 2010 dans le journal *Immunity* montre que l'inactivation spécifique du gène Act1 sur les cellules endothéliales n'influence pas

de manière significative le développement de l'EAE (Kang et al., 2010). Les auteurs en ont fait la démonstration en utilisant un modèle murin ($Act1^{lox/lox}/Tie2\text{-cre}$) dans lequel le gène *Act1* est supprimé uniquement dans les cellules portant le récepteur Tie-2, dont l'expression est restreinte presque exclusivement aux cellules endothéliales, leurs précurseurs (Kisanuki et al., 2001; Schnurch and Risau, 1993) et une fraction de monocytes (De Palma et al., 2003).

La liaison de l'IL-22 à son récepteur entraîne quant à elle la phosphorylation du facteur de transcription STAT-3 via l'activation des protéines tyrosine kinases de la famille Janus : JAK-1 (*Janus kinase 1*) et Tyk2 (*Tyrosine kinase 2*) (Wolk et al., 2010).

7.2 Effet de l'activation des récepteurs de l'IL-17 et l'IL-22 sur l'endothélium cérébral

Nous nous sommes donc intéressés plus précisément à l'effet de l'IL-17 et de l'IL-22 sur la perméabilité de l'endothélium cérébral. Nos études de perméabilité ont été réalisées sur le modèle *in vitro* de la BHE humaine (Prat et al., 2001), par mesure du taux de diffusion d'un traceur moléculaire, en l'occurrence l'albumine marquée au FITC. Nous montrons une nette augmentation de la perméabilité de la barrière lorsque les cellules endothéliales sont traitées avec 10 ou 100 ng/ml d'IL-17 ou d'IL-22. Cet effet est continu dans le temps (jusqu'à 72 heures après le traitement) et est fonction de la dose d'IL-17 ou d'IL-22 (Kebir et al., 2007).

L'IL-17 entraîne également une diminution de l'expression des molécules de jonctions serrées occludine et ZO-1 par les cellules endothéliales, laquelle serait sans doute en cause dans l'augmentation de la perméabilité de la BHE induite par cette cytokine. Nous observons d'ailleurs par Western blot, une réduction de l'expression protéique d'occludine, et à un moindre degré de ZO-1, dans des homogénéisats de moelle épinière provenant de souris EAE, comparativement à ceux issus de souris contrôles. *In situ*, on note une diminution du signal de ZO-1 dans des lésions cérébelleuses de souris immunisées avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ par rapport au signal bien défini entourant les vaisseaux dans la substance blanche d'apparence normale (Kebir et al., 2007).

Une autre étude a depuis repris et confirmé ces résultats chez la souris au moyen d'une lignée immortalisée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales murines. D'après Huppert *et al.*, l'IL-17 induirait une augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène par les cellules bEnd.3. Le stress oxydant causé par la surproduction de radicaux libres activerait la machinerie contractile des cellules endothéliales et serait responsable de la perte d'expression d'occludine et d'une perturbation de l'organisation structurale de ZO-1 (Huppert *et al.*, 2010).

Par contre, le traitement des cellules endothéliales avec l'IL-22, même à 100 ng/ml, n'induit pas de changement décelable dans l'expression protéique des jonctions serrées occludine, ZO-1 ou JAM-1 et ne semble donc pas être à l'origine de l'augmentation de la perméabilité induite par cette cytokine (Kebir *et al.*, 2007).

Outre les changements au niveau de la perméabilité de la BHE, l'IL-17 et l'IL-22 favorisent la sécrétion par les cellules endothéliales de la chimiokine MCP-1/CCL2 et induisent une augmentation de la migration de lymphocytes T CD4⁺ à travers l'endothélium. Parallèlement, les cellules endothéliales traitées avec l'IL-17 (100 ng/ml pendant 24 heures) secrètent plus d'IL-6 et d'IL-8/CXCL8 dans le surnageant de culture que les cellules non traitées. L'IL-17 n'affecte pas la production par la BHE de TGF- β , de RANTES/CCL5 et de IP-10/CXCL10 ni le niveau d'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 (Kebir *et al.*, 2007).

Une étude particulièrement intéressante publiée en 2011 dans le *Journal of Experimental Medicine* montre que l'IL-17 stimule également l'expression du récepteur de chimiokine CXCR7 sur l'endothélium cérébral chez la souris (Cruz-Orengo *et al.*, 2011). CXCR7, longtemps qualifié de récepteur orphelin, s'est révélé être un ligand de la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1 pour *stromal cell-derived factor 1*) (Burns *et al.*, 2006), elle-même exprimée sur la surface abluminale des microvaisseaux sanguins de la BHE. Originellement, CXCR4 était considéré comme le ligand exclusif de la chimiokine CXCL12. CXCL12 régule le trafic cellulaire vers le SNC en mobilisant les leucocytes exprimant le récepteur de chimiokine CXCR4 dans l'espace périvasculaire (McCandless *et al.*, 2006). Ainsi, le bon fonctionnement de l'axe de signalisation CXCL12–CXCR4 contribue à maintenir le privilège immun du SNC. Toutefois, la forte affinité de CXCR7 envers la chimiokine CXCL12 permettrait

de séquestrer CXCL12 dans les vésicules d'endosomes des cellules endothéliales, entraînant par le fait même une diminution de son expression à la surface de l'endothélium cérébral. L'activation du récepteur CXCR7 servirait donc à réguler la disponibilité de CXCL12 pour le ligand CXCR4. Les observations de Cruz-Orengo et collaborateurs suggèrent que l'augmentation d'expression de CXCR7 au niveau de la BHE, induite en réponse à une stimulation des cellules endothéliales avec l'IL-17, interfère avec le fonctionnement de l'axe CXCL12–CXCR4 et favorise par conséquent l'entrée des cellules immunitaires dans le parenchyme cérébral (Cruz-Orengo et al., 2011). D'ailleurs, les lésions de SEP sont associées avec une perte de l'expression de CXCL12 sur la surface abluminale de l'endothélium microvasculaire de la BHE (McCandless et al., 2008).

Les lymphocytes T_H17 seraient donc impliqués dans la fragilisation de la BHE. Ils exerceraient leur action délétère via la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22, deux cytokines qui induisent une augmentation de la perméabilité de l'endothélium cérébral et facilitent l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC. L'IL-17 provoquerait un affaiblissement des protéines de jonctions serrées, ce qui déstabiliserait l'endothélium cérébral et serait un facteur important impliqué dans le dysfonctionnement de la BHE au cours de la SEP. L'étude de Cruz-Orengo *et al.* suggère un mécanisme complémentaire selon lequel l'IL-17 influencerait le recrutement des leucocytes à travers la BHE.

7.3 Rôle de l'IFN- γ dans l'activation de l'endothélium vasculaire cérébral

Il est clairement établi que l'IFN- γ joue aussi un rôle majeur dans la fragilisation de la BHE. Il cause entre autres une perte de l'organisation architecturale des jonctions serrées et adhérentes de la BHE, en particulier l'occludine (Oshima et al., 2001) et la VE-cadhérine (Minagar et al., 2003). Par ailleurs, l'IFN- γ modifie le phénotype de la BHE en stimulant l'expression de plusieurs molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. À ce propos, les données de la littérature mettent surtout en évidence l'effet synergique de l'IFN- γ et du TNF dans l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 (Wong and Dorovini-Zis, 1992), VCAM-1 (Wong and Dorovini-Zis, 1995), ALCAM (Cayrol et al., 2008), MCAM (Larochelle et al., 2012) et Ninjurin-1 (Ifergan et al., 2011) par l'endothélium vasculaire cérébral. D'autres molécules de l'endothélium des capillaires cérébraux voient leur expression fortement stimulée en réponse à l'IFN- γ . On compte parmi celles-ci la E- et la P-sélectine (Carvalho-Tavares et al., 2000; Raab et al., 2002), le GM-CSF (Ifergan et al., 2008) et les chimiokines MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, IL-8/CXCL8 et RANTES/CCL5 (Prat et al., 2002). On peut donc penser que la production concomitante d'IFN- γ et d'IL-17 par les lymphocytes T_H17 leur confère un avantage considérable dans la fragilisation de la BHE, par le biais d'une activation de l'endothélium et une perméabilité accrue causée par la rupture des jonctions serrées.

8. Migration des lymphocytes T_H17 à travers la barrière hémato-encéphalique

La rupture de la BHE et l'infiltration de cellules immunitaires activées dans le SNC sont des étapes décisives dans la formation des lésions de SEP et l'évolution de la maladie. À cet égard, il a été démontré que les lymphocytes T_H1 migrent *in vitro* à travers la BHE humaine (Biernacki et al., 2001). La découverte des T_H17 et leur rôle indéniable dans la pathologie de l'EAE soulèvent une question importante, à savoir si ces cellules sont activement recrutées au SNC. Pour répondre à cette question, nous nous sommes servis à nouveau du modèle *in vitro* de la BHE humaine mis au point par le Dr Prat, et basé sur la culture primaire de cellules endothéliales provenant de cerveaux humains. Nous confirmons dans un tel modèle, que la migration de cellules CD4⁺CD45RO⁺ non activées (« *ex vivo* ») à travers l'endothélium est limitée comparativement à celle de lymphocytes CD4⁺CD45RO⁺

polarisés *in vitro* en T_H1 avec de l'IL-12 (Kebir et al., 2007), ce qui corrobore avec les résultats de Biernacki *et al.* (Biernacki et al., 2001). Les lymphocytes polarisés *in vitro* vers un profil T_H17 migrent de manière encore plus efficace à travers la BHE humaine. Une analyse phénotypique plus approfondie des lymphocytes T_H17 avant et après migration à travers la BHE, révèle un enrichissement des cellules IL-17⁺ et des cellules IL-22⁺ dans la chambre inférieure par rapport à la chambre supérieure, ce qui confirme que les lymphocytes T_H17 sont bel et bien en mesure de traverser la BHE *in vitro* (Kebir et al., 2007).

Avec l'appui du Dr Becher de l'Université de Zurich, nous avons également démontré qu'à l'instar des T_H1, les lymphocytes T_H17 migrent *in vivo* à travers la BHE et infiltrent le cerveau de souris Rag1^{-/-} (*Recombination activating gene 1*), déficientes en lymphocytes T et B. L'expérience consistait dans un premier temps à générer *in vitro* des lymphocytes T_H1 et T_H17 spécifiques envers le peptide MOG₃₅₋₅₅ à partir de splénocytes de souris 2D2 immunisées avec ce même peptide. Les souris 2D2 sont des souris transgéniques dont tous les lymphocytes T expriment un TCR qui reconnaît le peptide MOG₃₅₋₅₅ (Bettelli et al., 2003). Dans un second temps, les lymphocytes T_H1 et T_H17 générés *in vitro* ont été transférés séparément dans des souris Rag1^{-/-} dépourvues de cellules T et B. Sept jours suivant le transfert, nous récoltions le cerveau et la moelle épinière des souris Rag1^{-/-} et vérifions par cytométrie en flux la présence de cellules T infiltrant le SNC. Nous avons mesuré un nombre équivalent de cellules T CD4⁺ dans le SNC des souris Rag1^{-/-}, indépendamment du profil vers lequel les cellules donneuses avaient été polarisées, ce qui indique que les lymphocytes T_H17 injectés dans le système périphérique, tout comme les T_H1, traversent la BHE *in vivo* pour atteindre le SNC (Kebir et al., 2007).

In situ, l'analyse immunohistologique de coupes de cerveaux prélevés post-mortem sur des patients atteints de SEP révèle la présence d'un nombre important de cellules mémoires CD45RO⁺IL-17⁺ et CD45RO⁺IL-22⁺ au sein des lésions actives, particulièrement au niveau des infiltrats lymphocytaires péri-vasculaires. En revanche, ces cellules ne sont pas détectées dans les coupes de cerveau des sujets contrôles (Kebir et al., 2007). L'étude de Tzartos *et al.* vient appuyer nos résultats. En effet les auteurs rapportent aussi un enrichissement de la population de cellules CD4⁺IL-17⁺ dans les zones actives des lésions de SEP par rapport aux zones

inactives (Tzartos et al., 2008). Ils notent de surcroît la présence de lymphocytes T CD8⁺ exprimant de l'IL-17 au niveau des plaques actives.

En somme, nos résultats *in vitro*, *in vivo* et *in situ* mettent l'emphase sur l'importance des lymphocytes T_H17 dans les étapes initiales d'infiltration des cellules dans le SNC et leur implication potentielle dans la formation des lésions de SEP.

8.1 Molécules d'adhérence impliquées dans la migration des lymphocytes T_H17 à travers l'endothélium cérébral

Tel que mentionné dans le troisième chapitre d'introduction, la migration des cellules immunitaires à travers la BHE fait intervenir plusieurs molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules endothéliales et leurs contre-ligands présents sur les leucocytes (Carman and Springer, 2004; Springer, 1994). ICAM-1, VCAM-1, ALCAM et MCAM sont toutes fortement exprimées par l'endothélium cérébral activé et ont été mises en cause, entre autres, dans le recrutement des lymphocytes CD4⁺ au sein du SNC (Biernacki et al., 2001; Cayrol et al., 2008; Greenwood et al., 1995; Larochelle et al., 2012; Wong et al., 1999). Dans la continuité des travaux de recherche présentés dans mon premier article de thèse, nous nous sommes proposé d'identifier les molécules d'adhérence qui régissent la migration des lymphocytes T_H17 à travers la BHE. Nous avons donc analysé, d'une part, l'expression des intégrines LFA-1, VLA-4 et CD6 sur les lymphocytes T_H17 humains. Comme attendu, la vaste majorité (> 90%) des lymphocytes T humains activés *in vitro* et polarisés vers un profil T_H17 expriment ces intégrines membranaires ((Kebir et al., 2009) ; et données non publiées pour VLA-4 et CD6). En nous servant du modèle *in vitro* de la BHE humaine et d'anticorps bloquants dirigés contre les molécules d'adhérence correspondantes, nous montrons ensuite qu'ICAM-1 influence grandement la capacité des T_H17 à traverser la BHE tandis que VCAM-1 n'aurait qu'un effet négligeable. D'après Yoshizaki *et al.*, la migration des lymphocytes T_H17 depuis la circulation sanguine vers les tissus lésés des poumons et de la peau dans un modèle de sclérodémie systémique s'effectue aussi par l'intermédiaire de l'interaction LFA-1–ICAM-1 (Yoshizaki et al., 2010). Plus récemment, une étude conduite par le Dr Thomas Korn a confirmé la part importante que jouerait le couple LFA-1–ICAM-1 dans l'infiltration des lymphocytes T_H17 au

sein du parenchyme cérébral. Les auteurs montrent que l'administration d'un anticorps dirigé contre la molécule VLA-4 n'influence pas l'entrée des lymphocytes T_{H17} dans le cerveau, mais pourrait contribuer au processus de migration de ces cellules vers la moelle épinière chez les souris atteintes d'EAE. Les résultats de cette même étude suggèrent par ailleurs que l'interaction entre VLA-4 et VCAM-1 est en grande partie responsable de la migration des lymphocytes T_{H1} au sein du SNC, que ce soit au niveau de la moelle épinière ou du cerveau (Rothhammer et al., 2011). D'autres groupes soutiennent plutôt que les lymphocytes T_{H17} utilisent les cellules épithéliales des plexus choroïdes comme port d'entrée privilégié dans le SNC, via l'interaction entre le récepteur de chimiokine CCR6 et son ligand CCL20 (Reboldi et al., 2009). Toutefois, des données contradictoires en ce qui concerne la susceptibilité à l'EAE des souris déficientes en CCR6 (Elhofy et al., 2009; Villares et al., 2009) ne permettent pas de conclure en faveur de cette hypothèse. Par ailleurs, bien que le récepteur de chimiokine CCR6 soit exprimé de manière ubiquitaire sur l'ensemble des lymphocytes T_{H17} , la prudence reste de mise en ce qui concerne l'utilité de cette molécule comme cible thérapeutique dans le traitement de la SEP, surtout en raison de sa forte expression sur les lymphocytes T régulateurs (Kleinewietfeld et al., 2005; Yamazaki et al., 2008).

Finalement, le laboratoire du Dr Prat a montré que la molécule d'adhérence MCAM était omniprésente sur les lymphocytes T_{H17} et serait en partie responsable de leur recrutement au sein du SNC (Larochelle et al., 2012). Bien entendu, nous ne pouvons exclure que d'autres molécules d'adhérence puissent être impliquées dans la migration des lymphocytes T_{H17} vers le SNC ; le rôle individuel de chacune d'entre elles étant difficile à cerner. Reste à déterminer dans quelle mesure les différentes molécules d'adhérence se compensent.

8.2 Migration des lymphocytes T_{H17} producteurs d'IFN- γ à travers la barrière héméo-encéphalique

Compte tenu du fait que la molécule d'adhérence ICAM-1 semble largement impliquée dans le recrutement des lymphocytes T_{H17} au sein du parenchyme cérébral (Kebir et al., 2009; Rothhammer et al., 2011), il est raisonnable de penser que la production d'IFN- γ par ces cellules influence leur capacité de migration à

travers la BHE. Nous présumons en effet que les lymphocytes qui co-expriment l'IL-17 et l'IFN- γ sont plus aptes à franchir la BHE que ceux qui produisent uniquement l'une ou l'autre de ces cytokines. C'est d'ailleurs ce que nous observons dans notre système *in vitro* (Kebir et al., 2009). La sous-population de lymphocytes qui expriment à la fois l'IL-17 et l'IFN- γ est nettement enrichie dans la chambre inférieure, passant de $16,3\% \pm 2,2\%$ à $33,3\% \pm 2,6\%$ après avoir migré à travers la monocouche de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines. En revanche, la fréquence de cellules IL-17 simple-positives demeure relativement similaire dans les deux fractions de la chambre de Boyden ($14,9\% \pm 2,2\%$ avant migration et $21,7\% \pm 1,3\%$ après migration). D'une certaine manière, c'est comme si une réelle coopération se mettait en place entre l'IL-17 et l'IFN- γ au niveau de la BHE afin de promouvoir le recrutement des lymphocytes T_H17 producteurs d'IFN- γ au sein du SNC. D'une part, l'IL-17 entraîne une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire, induit un stress oxydant, une perte de l'expression et/ou une perturbation de l'organisation des protéines de jonction occludine et ZO-1 et stimule la libération de la chimiokine MCP-1/CCL12 par les cellules endothéliales (Huppert et al., 2010; Kebir et al., 2007). D'autre part, l'IFN- γ favorise le contact des lymphocytes T_H17 sur l'endothélium de la BHE en induisant l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et MCAM à la surface des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (Larochelle et al., 2012; Wong and Dorovini-Zis, 1992).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La BHE joue un rôle majeur au sein de l'unité neurovasculaire puisqu'elle représente l'interface principale entre la circulation sanguine et le parenchyme cérébral, régulant finement les échanges entre ces deux compartiments. Dans la SEP, un changement au niveau de l'intégrité de la BHE peut être observé avant même l'apparition des manifestations cliniques de la maladie (Kermode et al., 1990). Cette fragilisation de l'endothélium microvasculaire cérébral facilite l'infiltration massive de leucocytes au sein du SNC et constitue par le fait même un évènement précurseur de la formation des lésions de SEP (Filippi et al., 1998; Goodkin et al., 1998). Une meilleure caractérisation des partenaires moléculaires et cellulaires impliqués dans les interactions entre le système immunitaire et l'endothélium vasculaire cérébral s'avère donc cruciale pour l'étude et la compréhension des dérèglements qui surviennent dans les désordres neuro-inflammatoires comme ceux de la SEP. C'est d'ailleurs un des principaux axes de recherche du laboratoire du Dr Prat.

L'identification des lymphocytes T_H17 et leur rôle indéniable dans l'activation de réponse immunitaire associée à de nombreuses affections à caractère auto-immun les a propulsés au premier plan des recherches sur la physiopathologie de la SEP. Les avancées spectaculaires des dernières années ont permis de mieux définir ce sous-type de lymphocytes T effecteurs et leur rôle potentiellement délétère dans la pathogénèse de la SEP. En particulier, les travaux présentés dans cette thèse auront permis de faire la lumière sur les mécanismes d'entrée de ces effecteurs lymphocytaires dans le tissu nerveux et d'affiner nos connaissances sur les propriétés pro-inflammatoires des cytokines sécrétées par les T_H17 , notamment dans l'activation et la déstabilisation de l'endothélium cérébral. Notre groupe a par ailleurs été un des premiers à documenter la présence de cellules encéphalogéniques produisant non seulement de l'IL-17 mais aussi de l'IFN- γ et exprimant à la fois Tbet et RORC dans le contexte inflammatoire de la SEP. Ces observations laissaient entrevoir une certaine flexibilité du phénotype T_H17 , que études charnières de Lee *et al.* (Lee et al., 2009) et Hirota *et al.* (Hirota et al., 2011) ont considérablement contribué à éclaircir.

La notion de plasticité des lymphocytes T_H17 soulève toutefois une question importante qui pourrait avoir des implications majeures d'un point de vue clinique, à savoir si leur profil de sécrétion cytokinique varie au cours du temps et en fonction de l'évolution et/ou de la forme de SEP. C'est un point important à considérer surtout compte tenu du fait que dans le contexte inflammatoire de l'EAE, une grande proportion des lymphocytes T_H17 perdent la capacité de produire leur cytokine signature au fil du temps. Si l'on imagine une situation analogue chez l'humain où l'expression d'IL-17 ne serait que transitoire dans le cerveau des patients atteints de SEP, cela pourrait limiter l'efficacité d'inhibiteurs spécifiques de l'IL-17 en tant que thérapie. Au mieux, on devrait s'attendre à une réponse variable aux traitements anti-IL-17 d'un patient à l'autre, influencée par le stade de différenciation des lymphocytes T $CD4^+$. Une autre question sous-jacente à nos travaux et à ceux du groupe de Stockinger serait de savoir si la fonction des cellules productrices d'IFN- γ issues de précurseurs T_H17 diffère de celles des lymphocytes T_H1 conventionnels. Pour ce faire, des travaux supplémentaires sont nécessaires à l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques permettant de distinguer strictement ces deux populations lymphocytaires.

Au-delà du caractère malléable et transitoire des lymphocytes T_H17 , il conviendrait aussi de s'intéresser à la présence de ces effecteurs dans les formes progressives de la maladie. C'est une hypothèse qui a été peu préconisée jusqu'à maintenant puisqu'il a longtemps été sous-entendu que l'accumulation du handicap clinique chez les patients atteints des formes progressives de SEP était principalement causée par un processus neurodégénératif plutôt qu'auto-immun. Notons en revanche qu'un nombre croissant de données semble impliquer divers acteurs du système immunitaire dans la SEP progressive. Des études récentes démontrent en effet l'accumulation de petits amas leucocytaires localisés au niveau des méninges tant dans le modèle d'EAE (Peters et al., 2011; Pikor et al., 2015) que dans la SEP (Magliozzi et al., 2007; Serafini et al., 2004). Ces amas composés principalement de lymphocytes T et B sont associés à la présence de lésions corticales sous-piales, à une évolution plus rapide de la maladie (Magliozzi et al., 2010) et pourraient tenir une place essentielle dans la physiopathologie des formes progressives de SEP en promouvant la propagation de l'inflammation intrathécale. Les lymphocytes T_H17 , et

plus précisément l'IL-17, faciliteraient la formation de ces agrégats leucocytaires dans l'EAE (Peters et al., 2011). Nos connaissances sur le rôle de ces agrégats méningés demeurent cependant encore très fragmentaires. La déplétion des lymphocytes B à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD20 mène au ralentissement de la progression du handicap clinique chez les patients atteints de la forme progressive primaire de SEP et entraîne une amélioration significative de l'inflammation clinique et radiologique dans la forme récurrente de SEP (Hauser et al., 2017; Montalban et al., 2017). On attribue ces effets de l'anti-CD20 à son action directe sur les lymphocytes B. Au vu de la capacité des lymphocytes B à agir comme cellules présentatrices d'antigènes (Harp et al., 2010; Molnarfi et al., 2013), on pourrait envisager que les méninges constituent une niche immunologique privilégiée du SNC au sein de laquelle les lymphocytes B et T, y compris les T_H17, interagiraient et s'activeraient. Les méninges serviraient de lieu anatomique sous-tendant l'auto-immunité intrathécale à long terme dans la SEP. Il serait intéressant d'établir si la réponse T_H17 est affectée par la neutralisation des lymphocytes B en périphérie ou dans le SNC.

Par ailleurs, les techniques de séquençage nouvelle génération, comme le *Single Cell RNA Seq*, qui permet d'analyser le transcriptome à l'échelle de cellules individuelles permettra sans doute d'identifier de nouveaux marqueurs d'inflammation sur les lymphocytes T_H17 et documenter l'hétérogénéité de ces cellules au sein du SNC afin de mieux appréhender leur rôle dans la physiopathologie de la SEP.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* 37, 13-25.

Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 41-53.

Abromson-Leeman, S., Bronson, R.T., and Dorf, M.E. (2009). Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR gamma t consistently produce IFN γ but have a spectrum of IL-17 profiles. *Journal of neuroimmunology* 215, 10-24.

Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology* 8, 942-949.

Allt, G., and Lawrenson, J.G. (1997). Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies? *Brain Res Brain Res Rev* 24, 67-76.

Allt, G., and Lawrenson, J.G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells, tissues, organs* 169, 1-11.

Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods* 294, 15-22.

Alvarez, J.I., Cayrol, R., and Prat, A. (2011a). Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 1812, 252-264.

Alvarez, J.I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P.J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonniere, L., Bernard, M., *et al.* (2011b). The

Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* 334, 1727-1731.

Alvarez, J.I., Katayama, T., and Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 61, 1939-1958.

Amato, M.P., Derfuss, T., Hemmer, B., Liblau, R., Montalban, X., Soelberg Sorensen, P., Miller, D.H., and Group, E.F.W. (2017). Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016ECTRIMS focused workshop. *Multiple sclerosis*, 1352458516686847.

Amsen, D., Spilianakis, C.G., and Flavell, R.A. (2009). How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Current opinion in immunology* 21, 153-160.

Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., *et al.* (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* 204, 1849-1861.

Araki, M., Matsuoka, T., Miyamoto, K., Kusunoki, S., Okamoto, T., Murata, M., Miyake, S., Aranami, T., and Yamamura, T. (2014). Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology* 82, 1302-1306.

Armulik, A., Genove, G., Mae, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., *et al.* (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557-561.

Arnold, D.L., and Matthews, P.M. (2002). MRI in the diagnosis and management of multiple sclerosis. *Neurology* 58, S23-31.

Ascherio, A., and Munger, K.L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology* 61, 288-299.

Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature immunology* 8, 1380-1389.

Baecher-Allan, C., Kaskow, B.J., and Weiner, H.L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 97, 742-768.

Baeten, D., Sieper, J., Braun, J., Baraliakos, X., Dougados, M., Emery, P., Deodhar, A., Porter, B., Martin, R., Andersson, M., *et al.* (2015). Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *The New England journal of medicine* 373, 2534-2548.

Baker, D., Gerritsen, W., Rundle, J., and Amor, S. (2011). Critical appraisal of animal models of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 17, 647-657.

Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., and Hancock, W.W. (1999). CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6873-6878.

Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease* 16, 1-13.

Ban, M., Goris, A., Lorentzen, A.R., Baker, A., Mihalova, T., Ingram, G., Booth, D.R., Heard, R.N., Stewart, G.J., Bogaert, E., *et al.* (2009). Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *Eur J Hum Genet* 17, 1309-1313.

Bar-Or, A. (2008). The immunology of multiple sclerosis. *Seminars in neurology* 28, 29-45.

Baron, J.L., Madri, J.A., Ruddle, N.H., Hashim, G., and Janeway, C.A., Jr. (1993). Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *The Journal of experimental medicine* 177, 57-68.

Bartholomaeus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schlager, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E., Flugel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H., and Flugel, A. (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 462, 94-98.

Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., and Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology* 7, 929-936.

Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews* 84, 869-901.

Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *The Journal of clinical investigation* 110, 493-497.

Bednarczyk, J., and Lukasiuk, K. (2011). Tight junctions in neurological diseases. *Acta neurobiologiae experimentalis* 71, 393-408.

Ben-Nun, A., Wekerle, H., and Cohen, I.R. (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology* 11, 195-199.

Bending, D., De la Pena, H., Veldhoen, M., Phillips, J.M., Uyttenhove, C., Stockinger, B., and Cooke, A. (2009). Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 565-572.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Linington, C., Sobel, R.A., and Kuchroo, V.K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *The Journal of experimental medicine* 197, 1073-1081.

Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 200, 79-87.

Betts, M.R., and Koup, R.A. (2004). Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods in cell biology* 75, 497-512.

Beyer, M., and Schultze, J.L. (2011). Plasticity of T(reg) cells: is reprogramming of T(reg) cells possible in the presence of FOXP3? *International immunopharmacology* 11, 555-560.

Biedermann, T., Rocken, M., and Carballido, J.M. (2004). TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* 9, 5-14.

Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., Cortese, I., Kondo, T., Afshar, G., Gran, B., Eaton, J., Antel, J., Frank, J.A., *et al.* (2000). 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. *Nature medicine* 6, 1167-1175.

Biernacki, K., Prat, A., Blain, M., and Antel, J.P. (2001). Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60, 1127-1136.

Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., and Carton, H. (1988). Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *Journal of immunology* 140, 1506-1510.

Bissonnette, R., Luger, T., Thaci, D., Toth, D., Messina, I., You, R., Guana, A., Fox, T., Papavassilis, C., Gilloteau, I., and Mrowietz, U. (2017). Secukinumab sustains good efficacy and favourable safety in moderate-to-severe psoriasis after up to 3 years of treatment: results from a double-blind extension study. *Br J Dermatol* 177, 1033-1042.

Bitsch, A., and Bruck, W. (2002). Differentiation of multiple sclerosis subtypes: implications for treatment. *CNS drugs* 16, 405-418.

Blauvelt, A., Papp, K.A., Griffiths, C.E., Randazzo, B., Wasfi, Y., Shen, Y.K., Li, S., and Kimball, A.B. (2017). Efficacy and safety of guselkumab, an anti-interleukin-23 monoclonal antibody, compared with adalimumab for the continuous treatment of patients with moderate to severe psoriasis: Results from the phase III, double-blinded, placebo- and active comparator-controlled VOYAGE 1 trial. *J Am Acad Dermatol* 76, 405-417.

Blink, S.E., Caldis, M.W., Goings, G.E., Harp, C.T., Malissen, B., Prinz, I., Xu, D., and Miller, S.D. (2014). gammadelta T cell subsets play opposing roles in regulating experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular immunology* 290, 39-51.

Bo, L., Vedeler, C.A., Nyland, H., Trapp, B.D., and Mork, S.J. (2003). Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Multiple sclerosis* 9, 323-331.

Boven, L.A., Montagne, L., Nottet, H.S., and De Groot, C.J. (2000). Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clinical and experimental immunology* 122, 257-263.

Brok, H.P., van Meurs, M., Blezer, E., Schantz, A., Peritt, D., Treacy, G., Laman, J.D., Bauer, J., and t Hart, B.A. (2002). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *Journal of immunology* 169, 6554-6563.

Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J., and Tolosa, E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 132, 3329-3341.

Brustle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature immunology* 8, 958-966.

Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, II, Littman, D.R., Maloy, K.J., and Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 464, 1371-1375.

Burns, J., Bartholomew, B., and Lobo, S. (1999). Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 45, 33-39.

Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., *et al.* (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine* 203, 2201-2213.

Burt, R.K., Cohen, B.A., Russell, E., Spero, K., Joshi, A., Oyama, Y., Karpus, W.J., Luo, K., Jovanovic, B., Traynor, A., *et al.* (2003). Hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: failure of a total body irradiation-based conditioning regimen to prevent disease progression in patients with high disability scores. *Blood* 102, 2373-2378.

Calabrese, M., Magliozzi, R., Ciccarelli, O., Geurts, J.J., Reynolds, R., and Martin, R. (2015). Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neuroscience* 16, 147-158.

Cannella, B., and Raine, C.S. (1995). The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* 37, 424-435.

Carding, S.R., and Egan, P.J. (2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 2, 336-345.

Carman, C.V. (2009). Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *Journal of cell science* 122, 3025-3035.

Carman, C.V., and Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *The Journal of cell biology* 167, 377-388.

Carvalho-Tavares, J., Hickey, M.J., Hutchison, J., Michaud, J., Sutcliffe, I.T., and Kubes, P. (2000). A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circulation research* 87, 1141-1148.

Carvey, P.M., Hendey, B., and Monahan, A.J. (2009). The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *Journal of neurochemistry* 111, 291-314.

Cayrol, R., Haqqani, A.S., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., and Prat, A. (2011). Isolation of human brain endothelial cells and characterization of lipid raft-associated proteins by mass spectroscopy. *Methods in molecular biology* 686, 275-295.

Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J.L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A.S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., *et al.* (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nature immunology* 9, 137-145.

Chabas, D. (2006). [Recent advances in the immunology of multiple sclerosis]. *Revue neurologique* 162, 162-173.

Chang, S.H., Park, H., and Dong, C. (2006). Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *The Journal of biological chemistry* 281, 35603-35607.

Chen, Y., Langrish, C.L., McKenzie, B., Joyce-Shaikh, B., Stumhofer, J.S., McClanahan, T., Blumenschein, W., Churakovsa, T., Low, J., Presta, L., *et al.* (2006). Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation* 116, 1317-1326.

Chien, Y.H., and Konigshofer, Y. (2007). Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunological reviews* 215, 46-58.

Chitnis, T., Najafian, N., Benou, C., Salama, A.D., Grusby, M.J., Sayegh, M.H., and Khoury, S.J. (2001). Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation* 108, 739-747.

Chung, Y., Chang, S.H., Martinez, G.J., Yang, X.O., Nurieva, R., Kang, H.S., Ma, L., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., and Dong, C. (2009). Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30, 576-587.

Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* 12, 560-567.

Colonna, M., and Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35, 441-468.

Comabella, M., and Khoury, S.J. (2012). Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical immunology* 142, 2-8.

Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517.

Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M.M., Cortinovis-Tourniaire, P., and Moreau, T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *The New England journal of medicine* 339, 285-291.

Corvaisier, M., Delneste, Y., Jeanvoine, H., Preisser, L., Blanchard, S., Garo, E., Hoppe, E., Barre, B., Audran, M., Bouvard, B., *et al.* (2012). IL-26 Is Overexpressed in Rheumatoid Arthritis and Induces Proinflammatory Cytokine Production and Th17 Cell Generation. *PLoS biology* 10, e1001395.

Cross, A.H., Trotter, J.L., and Lyons, J. (2001). B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *Journal of neuroimmunology* 112, 1-14.

Croxford, A.L., Mair, F., and Becher, B. (2012). IL-23: One cytokine in control of autoimmunity. *European journal of immunology* 42, 2263-2273.

Cruz-Orengo, L., Holman, D.W., Dorsey, D., Zhou, L., Zhang, P., Wright, M., McCandless, E.E., Patel, J.R., Luker, G.D., Littman, D.R., *et al.* (2011). CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 208, 327-339.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.

da Fonseca, A.C., Matias, D., Garcia, C., Amaral, R., Geraldo, L.H., Freitas, C., and Lima, F.R. (2014). The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci* 8, 362.

Dambacher, J., Beigel, F., Zitzmann, K., De Toni, E.N., Goke, B., Diepolder, H.M., Auernhammer, C.J., and Brand, S. (2009). The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58, 1207-1217.

De Jager, P.L., Jia, X., Wang, J., de Bakker, P.I., Ottoboni, L., Aggarwal, N.T., Piccio, L., Raychaudhuri, S., Tran, D., Aubin, C., *et al.* (2009). Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature genetics* 41, 776-782.

De Palma, M., Venneri, M.A., Roca, C., and Naldini, L. (2003). Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nature medicine* 9, 789-795.

Dean, G., and Elian, M. (1997). Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 63, 565-568.

Dehouck, M.P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., and Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *Journal of neurochemistry* 54, 1798-1801.

Deli, M.A., Abraham, C.S., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cellular and molecular neurobiology* 25, 59-127.

Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature reviews. Immunology* 15, 545-558.

Devadas, S., Das, J., Liu, C., Zhang, L., Roberts, A.I., Pan, Z., Moore, P.A., Das, G., and Shi, Y. (2006). Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* 25, 237-247.

Dijkstra, C.D., De Groot, C.J., and Huitinga, I. (1992). The role of macrophages in demyelination. *Journal of neuroimmunology* 40, 183-188.

Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., van Horssen, J., Haqqani, A.S., de Vries, H.E., Engelhardt, B., Greenwood, J., and Prat, A. (2009). Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier. *Journal of molecular medicine* 87, 765-774.

Dolhain, R.J., van der Heiden, A.N., ter Haar, N.T., Breedveld, F.C., and Miltenburg, A.M. (1996). Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 39, 1961-1969.

Donnelly, R.P., Sheikh, F., Dickensheets, H., Savan, R., Young, H.A., and Walter, M.R. (2010). Interleukin-26: an IL-10-related cytokine produced by Th17 cells. *Cytokine & growth factor reviews* 21, 393-401.

Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., *et al.* (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology* 10, 857-863.

Dumoutier, L., Lejeune, D., Colau, D., and Renauld, J.C. (2001). Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *Journal of immunology* 166, 7090-7095.

Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P., Ferrero, B., Eid, P., and Novelli, F. (2009). T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Annals of neurology* 65, 499-509.

Dyment, D.A., Ebers, G.C., and Sadovnick, A.D. (2004). Genetics of multiple sclerosis. *Lancet neurology* 3, 104-110.

Dyment, D.A., Herrera, B.M., Cader, M.Z., Willer, C.J., Lincoln, M.R., Sadovnick, A.D., Risch, N., and Ebers, G.C. (2005). Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Human molecular genetics* 14, 2019-2026.

El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., and Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* 12, 568-575.

Elhofy, A., Depaolo, R.W., Lira, S.A., Lukacs, N.W., and Karpus, W.J. (2009). Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 213, 91-99.

Engelhardt, B. (2006). Regulation of immune cell entry into the central nervous system. *Results and problems in cell differentiation* 43, 259-280.

Engelhardt, B. (2008). Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *Journal of the neurological sciences* 274, 23-26.

Engelhardt, B., and Kappos, L. (2008). Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *Neuro-degenerative diseases* 5, 16-22.

Engelhardt, B., Laschinger, M., Schulz, M., Samulowitz, U., Vestweber, D., and Hoch, G. (1998). The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *The Journal of clinical investigation* 102, 2096-2105.

Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends in immunology*.

Engelhardt, B., and Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in immunopathology* 31, 497-511.

Engelhardt, B., Vajkoczy, P., and Weller, R.O. (2017). The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature immunology* 18, 123-131.

Fadil, H., Kelley, R.E., and Gonzalez-Toledo, E. (2007). Differential diagnosis of multiple sclerosis. *International review of neurobiology* 79, 393-422.

Farkas, E., and Luiten, P.G. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology* 64, 575-611.

Feagan, B.G., Sandborn, W.J., D'Haens, G., Panes, J., Kaser, A., Ferrante, M., Louis, E., Franchimont, D., Dewit, O., Seidler, U., *et al.* (2017). Induction therapy with the selective interleukin-23 inhibitor risankizumab in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* 389, 1699-1709.

Feagan, B.G., Sandborn, W.J., Gasink, C., Jacobstein, D., Lang, Y., Friedman, J.R., Blank, M.A., Johanns, J., Gao, L.L., Miao, Y., *et al.* (2016). Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *The New England journal of medicine* 375, 1946-1960.

Fenstermacher, J., Gross, P., Sposito, N., Acuff, V., Pettersen, S., and Gruber, K. (1988). Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 529, 21-30.

Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of immunology* 156, 5-7.

Fife, B.T., Huffnagle, G.B., Kuziel, W.A., and Karpus, W.J. (2000). CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 192, 899-905.

Filippi, M., Rocca, M.A., Martino, G., Horsfield, M.A., and Comi, G. (1998). Magnetization transfer changes in the normal appearing white matter precede the appearance of enhancing lesions in patients with multiple sclerosis. *Annals of neurology* 43, 809-814.

Fisher, S.A., Tremelling, M., Anderson, C.A., Gwilliam, R., Bumpstead, S., Prescott, N.J., Nimmo, E.R., Massey, D., Berzuini, C., Johnson, C., *et al.* (2008). Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature genetics* 40, 710-712.

Flanagan, K., Fitzgerald, K., Baker, J., Regnstrom, K., Gardai, S., Bard, F., Mocci, S., Seto, P., You, M., Larochelle, C., *et al.* (2012). Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PloS one* 7, e40443.

Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., and Mills, K.H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and experimental immunology* 162, 1-11.

Flugel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D.E., Li, Z., Ellwart, J.W., Willem, M., Lassmann, H., and Wekerle, H. (2001). Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 14, 547-560.

Forster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and cell biology* 130, 55-70.

Frisullo, G., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A.K., Marti, A., Caggiula, M., Mirabella, M., Tonali, P.A., and Batocchi, A.P. (2008). IL17 and IFN γ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine* 44, 22-25.

Fugger, L., and Svejgaard, A. (2000). Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. *Arthritis research* 2, 208-211.

Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.

Gaffen, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews. Immunology* 9, 556-567.

Gaffen, S.L. (2011). Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Current opinion in immunology* 23, 613-619.

Garcia, C.M., Darland, D.C., Massingham, L.J., and D'Amore, P.A. (2004). Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain research. Developmental brain research* 152, 25-38.

Genain, C.P., Cannella, B., Hauser, S.L., and Raine, C.S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature medicine* 5, 170-175.

Genovese, M.C., Van den Bosch, F., Roberson, S.A., Bojin, S., Biagini, I.M., Ryan, P., and Sloan-Lancaster, J. (2010). LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis and rheumatism* 62, 929-939.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Hirahara, K., and O'Shea, J.J. (2011). T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends in immunology* 32, 395-401.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., *et al.* (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467, 967-971.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.

Giovannoni, G., Cutter, G.R., Lunemann, J., Martin, R., Munz, C., Sriram, S., Steiner, I., Hammerschlag, M.R., and Gaydos, C.A. (2006). Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet neurology* 5, 887-894.

Giovannoni, G., and Ebers, G. (2007). Multiple sclerosis: the environment and causation. *Current opinion in neurology* 20, 261-268.

Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol* 126, 25-31.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., and Rodewald, H.R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547-551.

Goodkin, D.E., Rooney, W.D., Sloan, R., Bacchetti, P., Gee, L., Vermathen, M., Waubant, E., Abundo, M., Majumdar, S., Nelson, S., and Weiner, M.W. (1998). A serial study of new MS lesions and the white matter from which they arise. *Neurology* 51, 1689-1697.

Gordon, K.B., Colombel, J.F., and Hardin, D.S. (2016). Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *The New England journal of medicine* 375, 2102.

Gordon, K.B., Strober, B., Lebwohl, M., Augustin, M., Blauvelt, A., Poulin, Y., Papp, K.A., Sofen, H., Puig, L., Foley, P., *et al.* (2018). Efficacy and safety of risankizumab in moderate-to-severe plaque psoriasis (UltIMMa-1 and UltIMMa-2): results from two double-blind, randomised, placebo-controlled and ustekinumab-controlled phase 3 trials. *Lancet* 392, 650-661.

Gotsch, U., Jager, U., Dominis, M., and Vestweber, D. (1994). Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell adhesion and communication* 2, 7-14.

Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature reviews. Immunology* 9, 393-407.

Graber, J.J., Allie, S.R., Mullen, K.M., Jones, M.V., Wang, T., Krishnan, C., Kaplin, A.I., Nath, A., Kerr, D.A., and Calabresi, P.A. (2008). Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 196, 124-132.

Greenwood, J., Heasman, S.J., Alvarez, J.I., Prat, A., Lyck, R., and Engelhardt, B. (2011). Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathology and applied neurobiology* 37, 24-39.

Greenwood, J., Wang, Y., and Calder, V.L. (1995). Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology* 86, 408-415.

Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., and Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature medicine* 11, 328-334.

Greter, M., Lelios, I., and Croxford, A.L. (2015). Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol* 6, 249.

Haak, S., Croxford, A.L., Kreymborg, K., Heppner, F.L., Pouly, S., Becher, B., and Waisman, A. (2009). IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 61-69.

Handel, A.E., Lincoln, M.R., and Ramagopalan, S.V. (2011). Of mice and men: experimental autoimmune encephalitis and multiple sclerosis. *European journal of clinical investigation* 41, 1254-1258.

Harp, C.T., Ireland, S., Davis, L.S., Remington, G., Cassidy, B., Cravens, P.D., Stuve, O., Lovett-Racke, A.E., Eagar, T.N., Greenberg, B.M., *et al.* (2010). Memory B cells from a subset of treatment-naive relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN-gamma production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *European journal of immunology* 40, 2942-2956.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* 6, 1123-1132.

Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., *et al.* (2007). Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *Journal of immunology* 179, 4313-4317.

Hatfield, J.K., and Brown, M.A. (2015). Group 3 innate lymphoid cells accumulate and exhibit disease-induced activation in the meninges in EAE. *Cellular immunology* 297, 69-79.

Hauser, S.L., Bar-Or, A., Comi, G., Giovannoni, G., Hartung, H.P., Hemmer, B., Lublin, F., Montalban, X., Rammohan, K.W., Selmaj, K., *et al.* (2017). Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine* 376, 221-234.

Havrdova, E., Belova, A., Goloborodko, A., Tisserant, A., Wright, A., Wallstroem, E., Garren, H., Maguire, R.P., and Johns, D.R. (2016). Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J Neurol* 263, 1287-1295.

Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews* 57, 173-185.

Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., and Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19, 13-26.

He, F., and Sun, Y.E. (2007). Glial cells more than support cells? *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 661-665.

Hellings, N., Baree, M., Verhoeven, C., D'Hooghe M, B., Medaer, R., Bernard, C.C., Raus, J., and Stinissen, P. (2001). T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Journal of neuroscience research* 63, 290-302.

Hellstrom, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., and Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology* 153, 543-553.

Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., *et al.* (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology* 12, 255-263.

Hofstetter, H.H., Shive, C.L., and Forsthuber, T.G. (2002). Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *Journal of immunology* 169, 117-125.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.

Hueber, W., Patel, D.D., Dryja, T., Wright, A.M., Koroleva, I., Bruin, G., Antoni, C., Draelos, Z., Gold, M.H., Psoriasis Study, G., *et al.* (2010). Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Science translational medicine* 2, 52ra72.

Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H.J., Waisman, A., and Kuhlmann, C.R. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 1023-1034.

Hvas, J., Oksenberg, J.R., Fernando, R., Steinman, L., and Bernard, C.C. (1993). Gamma delta T cell receptor repertoire in brain lesions of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 46, 225-234.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

Ichikawa, M., Koh, C.S., Inoue, A., Tsuyusaki, J., Yamazaki, M., Inaba, Y., Sekiguchi, Y., Itoh, M., Yagita, H., and Komiyama, A. (2000). Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of multiple sclerosis-like relapsing-remitting demyelinating disease in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *Journal of neuroimmunology* 102, 56-66.

Ifergan, I., Kebir, H., Bernard, M., Wosik, K., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Arbour, N., and Prat, A. (2008). The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain : a journal of neurology* 131, 785-799.

Ifergan, I., Kebir, H., Terouz, S., Alvarez, J.I., Lecuyer, M.A., Gendron, S., Bourbonniere, L., Dunay, I.R., Bouthillier, A., Moumdjian, R., *et al.* (2011). Role of Ninjurin-1 in the migration of myeloid cells to central nervous system inflammatory lesions. *Annals of neurology* 70, 751-763.

Igarashi, Y., Utsumi, H., Chiba, H., Yamada-Sasamori, Y., Tobioka, H., Kamimura, Y., Furuuchi, K., Kokai, Y., Nakagawa, T., Mori, M., and Sawada, N. (1999). Glial

cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochemical and biophysical research communications* 261, 108-112.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., *et al.* (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England journal of medicine* 357, 851-862.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., Wellcome Trust Case Control, C., Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., *et al.* (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476, 214-219.

Ishizu, T., Osoegawa, M., Mei, F.J., Kikuchi, H., Tanaka, M., Takakura, Y., Minohara, M., Murai, H., Mihara, F., Taniwaki, T., and Kira, J. (2005). Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 128, 988-1002.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., and Nakae, S. (2011). Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34, 149-162.

Izikhon, L., Klein, R.S., Charo, I.F., Weiner, H.L., and Luster, A.D. (2000). Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *The Journal of experimental medicine* 192, 1075-1080.

Jingwu, Z., Medaer, R., Hashim, G.A., Chin, Y., van den Berg-Loonen, E., and Raus, J.C. (1992). Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and

controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Annals of neurology* 32, 330-338.

Jones, S.A., Sutton, C.E., Cua, D., and Mills, K.H. (2012). Therapeutic potential of targeting IL-17. *Nature immunology* 13, 1022-1025.

Kang, Z., Altuntas, C.Z., Gulen, M.F., Liu, C., Giltiay, N., Qin, H., Liu, L., Qian, W., Ransohoff, R.M., Bergmann, C., *et al.* (2010). Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 32, 414-425.

Kappos, L., Bates, D., Edan, G., Eraksoy, M., Garcia-Merino, A., Grigoriadis, N., Hartung, H.P., Havrdova, E., Hillert, J., Hohlfeld, R., *et al.* (2011). Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet neurology* 10, 745-758.

Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J.I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., and Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 66, 390-402.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine* 13, 1173-1175.

Kelly, M., Hwang, J.M., and Kubes, P. (2007). Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120, 3-10.

Kermode, A.G., Thompson, A.J., Tofts, P., MacManus, D.G., Kendall, B.E., Kingsley, D.P., Moseley, I.F., Rudge, P., and McDonald, W.I. (1990). Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. *Brain : a journal of neurology* 113 (Pt 5), 1477-1489.

Kim, J.I., Ho, I.C., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10, 745-751.

Kirk, J., Plumb, J., Mirakhur, M., and McQuaid, S. (2003). Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *The Journal of pathology* 201, 319-327.

Kisanuki, Y.Y., Hammer, R.E., Miyazaki, J., Williams, S.C., Richardson, J.A., and Yanagisawa, M. (2001). Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Developmental biology* 230, 230-242.

Kleynwiefeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Rotzschke, O., and Falk, K. (2005). CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood* 105, 2877-2886.

Kleinschek, M.A., Owyang, A.M., Joyce-Shaikh, B., Langrish, C.L., Chen, Y., Gorman, D.M., Blumenschein, W.M., McClanahan, T., Brombacher, F., Hurst, S.D., *et al.* (2007). IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 204, 161-170.

Kleinschmidt-DeMasters, B.K., and Tyler, K.L. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 353, 369-374.

Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 170, 827-845.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 177, 566-573.

Konigshofer, Y., and Chien, Y.H. (2006). Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes? *Current opinion in immunology* 18, 527-533.

Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448, 484-487.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27, 485-517.

Korn, T., Mitsdoerffer, M., and Kuchroo, V.K. (2010). Immunological basis for the development of tissue inflammation and organ-specific autoimmunity in animal models of multiple sclerosis. *Results and problems in cell differentiation* 51, 43-74.

Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., *et al.* (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation* 103, 1345-1352.

Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., and Pestka, S. (2001). Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *The Journal of biological chemistry* 276, 2725-2732.

Krakowski, M., and Owens, T. (1996). Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *European journal of immunology* 26, 1641-1646.

Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F.L., Renauld, J.C., and Becher, B. (2007). IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 179, 8098-8104.

Kroenke, M.A., Carlson, T.J., Andjelkovic, A.V., and Segal, B.M. (2008). IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *The Journal of experimental medicine* 205, 1535-1541.

Kubes, P., and Ward, P.A. (2000). Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain pathology* 10, 127-135.

Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., and Glimcher, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80, 707-718.

Kurtzke, J.F. (2000). Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *Journal of neurovirology* 6 Suppl 2, S134-140.

Langer-Gould, A., Atlas, S.W., Green, A.J., Bollen, A.W., and Pelletier, D. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *The New England journal of medicine* 353, 375-381.

Langley, R.G., Tsai, T.F., Flavin, S., Song, M., Randazzo, B., Wasfi, Y., Jiang, J., Li, S., and Puig, L. (2018). Efficacy and safety of guselkumab in patients with psoriasis who have an inadequate response to ustekinumab: results of the randomized, double-blind, phase III NAVIGATE trial. *Br J Dermatol* 178, 114-123.

Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 201, 233-240.

Larochelle, C., Alvarez, J.I., and Prat, A. (2011). How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS letters* 585, 3770-3780.

Larochelle, C., Cayrol, R., Kebir, H., Alvarez, J.I., Lecuyer, M.A., Ifergan, I., Viel, E., Bourbonniere, L., Beauseigle, D., Terouz, S., *et al.* (2012). Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain : a journal of neurology*.

Lassmann, H., Bruck, W., and Lucchinetti, C.F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology* 17, 210-218.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371-381.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.

Lee, G.R., and Flavell, R.A. (2004). Transgenic mice which overproduce Th2 cytokines develop spontaneous atopic dermatitis and asthma. *International immunology* 16, 1155-1160.

Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., and Weaver, C.T. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30, 92-107.

Leonardi, C.L., Kimball, A.B., Papp, K.A., Yeilding, N., Guzzo, C., Wang, Y., Li, S., Dooley, L.T., Gordon, K.B., and investigators, P.s. (2008). Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet* 371, 1665-1674.

Letko, E., Yeh, S., Foster, C.S., Pleyer, U., Brigell, M., Grosskreutz, C.L., and Group, A.A.S. (2015). Efficacy and safety of intravenous secukinumab in noninfectious uveitis requiring steroid-sparing immunosuppressive therapy. *Ophthalmology* 122, 939-948.

Lexberg, M.H., Taubner, A., Forster, A., Albrecht, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., and Chang, H.D. (2008). Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *European journal of immunology* 38, 2654-2664.

Li, M.O., and Flavell, R.A. (2008). TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134, 392-404.

Li, Y., Wang, H., Long, Y., Lu, Z., and Hu, X. (2011). Increased memory Th17 cells in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 234, 155-160.

Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* 203, 2271-2279.

Linthicum, D.S., Munoz, J.J., and Blaskett, A. (1982). Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of *Bordetella pertussis* is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cellular immunology* 73, 299-310.

Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., *et al.* (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine* 8, 500-508.

Longbrake, E.E., and Racke, M.K. (2009). Why did IL-12/IL-23 antibody therapy fail in multiple sclerosis? *Expert review of neurotherapeutics* 9, 319-321.

Lou, O., Alcaide, P., Luscinskas, F.W., and Muller, W.A. (2007). CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *Journal of immunology* 178, 1136-1143.

Louten, J., Boniface, K., and de Waal Malefyt, R. (2009). Development and function of TH17 cells in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123, 1004-1011.

Lovett-Racke, A.E., Rocchini, A.E., Choy, J., Northrop, S.C., Hussain, R.Z., Ratts, R.B., Sikder, D., and Racke, M.K. (2004). Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity* 21, 719-731.

Lovett-Racke, A.E., Yang, Y., and Racke, M.K. (2011). Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochimica et biophysica acta* 1812, 246-251.

Lubberts, E., Joosten, L.A., van de Loo, F.A., Schwarzenberger, P., Kolls, J., and van den Berg, W.B. (2002). Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 51, 102-104.

Lubberts, E., Koenders, M.I., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C.J., Joosten, L.A., and van den Berg, W.B. (2004). Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis and rheumatism* 50, 650-659.

Lublin, F.D., and Reingold, S.C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-911.

Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sorensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., *et al.* (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83, 278-286.

Lucchinetti, C., Bruck, W., and Noseworthy, J. (2001). Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment. *Current opinion in neurology* 14, 259-269.

Lucchinetti, C.F., Bruck, W., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (1996). Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain pathology* 6, 259-274.

Lucchinetti, C.F., Popescu, B.F., Bunyan, R.F., Moll, N.M., Roemer, S.F., Lassmann, H., Bruck, W., Parisi, J.E., Scheithauer, B.W., Giannini, C., *et al.* (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 365, 2188-2197.

Lukens, J.R., Barr, M.J., Chaplin, D.D., Chi, H., and Kanneganti, T.D. (2012). Inflammasome-derived IL-1beta regulates the production of GM-CSF by CD4(+) T cells and gammadelta T cells. *Journal of immunology* 188, 3107-3115.

Lunde, H.M.B., Assmus, J., Myhr, K.M., Bo, L., and Grytten, N. (2017). Survival and cause of death in multiple sclerosis: a 60-year longitudinal population study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 88, 621-625.

Lundmark, F., Duvefelt, K., Jacobaeus, E., Kockum, I., Wallstrom, E., Khademi, M., Oturai, A., Ryder, L.P., Saarela, J., Harbo, H.F., *et al.* (2007). Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nature genetics* 39, 1108-1113.

Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature immunology* 6, 1182-1190.

Lyck, R., and Engelhardt, B. (2012). Going Against the Tide - How Encephalitogenic T Cells Breach the Blood-Brain Barrier. *Journal of vascular research* 49, 497-509.

Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., and Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain : a journal of neurology* 130, 1089-1104.

Magliozzi, R., Howell, O.W., Reeves, C., Roncaroli, F., Nicholas, R., Serafini, B., Aloisi, F., and Reynolds, R. (2010). A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 68, 477-493.

Mahad, D., Callahan, M.K., Williams, K.A., Ubogu, E.E., Kivisakk, P., Tucky, B., Kidd, G., Kingsbury, G.A., Chang, A., Fox, R.J., *et al.* (2006). Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain : a journal of neurology* 129, 212-223.

Mair, F., and Becher, B. (2014). Thy1+ Sca1+ innate lymphoid cells infiltrate the CNS during autoimmune inflammation, but do not contribute to disease development. *European journal of immunology* 44, 37-45.

Man, S., Ubogu, E.E., and Ransohoff, R.M. (2007). Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain pathology* 17, 243-250.

Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nature immunology* 9, 641-649.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.

Marrie, R.A., Elliott, L., Marriott, J., Cossoy, M., Blanchard, J., Leung, S., and Yu, N. (2015). Effect of comorbidity on mortality in multiple sclerosis. *Neurology* 85, 240-247.

Martin, B., Hirota, K., Cua, D.J., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 31, 321-330.

Matusevicius, D., Kivisakk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., and Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 5, 101-104.

Mazzetti, S., Frigerio, S., Gelati, M., Salmaggi, A., and Vitellaro-Zuccarello, L. (2004). Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system. *European journal of histochemistry : EJH* 48, 423-428.

McAllister, M.S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F., Naftalin, R.J., Pedley, K.C., Mayberg, M.R., Marroni, M., Leaman, S., Stanness, K.A., and Janigro, D. (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain research* 904, 20-30.

McCandless, E.E., Piccio, L., Woerner, B.M., Schmidt, R.E., Rubin, J.B., Cross, A.H., and Klein, R.S. (2008). Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *The American journal of pathology* 172, 799-808.

McCandless, E.E., Wang, Q., Woerner, B.M., Harper, J.M., and Klein, R.S. (2006). CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 177, 8053-8064.

McCarthy, K.M., Skare, I.B., Stankewich, M.C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R.A., Lynch, R.D., and Schneeberger, E.E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *Journal of cell science* 109 (Pt 9), 2287-2298.

McDonald, D.R. (2012). TH17 deficiency in human disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 129, 1429-1435; quiz 1436-1427.

McFarland, H.F., and Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology* 8, 913-919.

McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature immunology* 8, 1390-1397.

McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J., and Cua, D.J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature immunology* 10, 314-324.

McInnes, I.B., Mease, P.J., Kirkham, B., Kavanaugh, A., Ritchlin, C.T., Rahman, P., van der Heijde, D., Landewe, R., Conaghan, P.G., Gottlieb, A.B., *et al.* (2015). Secukinumab, a human anti-interleukin-17A monoclonal antibody, in patients with psoriatic arthritis (FUTURE 2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 386, 1137-1146.

McMahon, E.J., Bailey, S.L., Castenada, C.V., Waldner, H., and Miller, S.D. (2005). Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature medicine* 11, 335-339.

McQualter, J.L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T.W., Hamilton, J.A., Reid, H.H., and Bernard, C.C. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 194, 873-882.

Mealy, M.A., Wingerchuk, D.M., Greenberg, B.M., and Levy, M. (2012). Epidemiology of neuromyelitis optica in the United States: a multicenter analysis. *Archives of neurology* 69, 1176-1180.

Menge, T., Weber, M.S., Hemmer, B., Kieseier, B.C., von Budingen, H.C., Warnke, C., Zamvil, S.S., Boster, A., Khan, O., Hartung, H.P., and Stuve, O. (2008). Disease-

modifying agents for multiple sclerosis: recent advances and future prospects. *Drugs* 68, 2445-2468.

Merrill, J.E. (1992). Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of immunotherapy : official journal of the Society for Biological Therapy* 12, 167-170.

Miller, D.H., Khan, O.A., Sheremata, W.A., Blumhardt, L.D., Rice, G.P., Libonati, M.A., Willmer-Hulme, A.J., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., O'Connor, P.W., and International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial, G. (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 348, 15-23.

Miller, D.H., and Leary, S.M. (2007). Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet neurology* 6, 903-912.

Miller, S.D., and Karpus, W.J. (2007). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.] Chapter 15, Unit 15 11.*

Mills, K.H. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European journal of immunology* 38, 2636-2649.

Minagar, A., and Alexander, J.S. (2003). Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 9, 540-549.

Minagar, A., Long, A., Ma, T., Jackson, T.H., Kelley, R.E., Ostanin, D.V., Sasaki, M., Warren, A.C., Jawahar, A., Cappell, B., and Alexander, J.S. (2003). Interferon (IFN)-beta 1a and IFN-beta 1b block IFN-gamma-induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier. *Endothelium : journal of endothelial cell research* 10, 299-307.

Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and T(H)17 cells in chronic inflammation. *Nature reviews. Drug discovery* 11, 763-776.

Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H.P., and Zettl, U.K. (2010). Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Progress in neurobiology* 92, 386-404.

Miyagishi, R., Kikuchi, S., Fukazawa, T., and Tashiro, K. (1995). Macrophage inflammatory protein-1 alpha in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. *Journal of the neurological sciences* 129, 223-227.

Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M.S., Patarroyo, J.C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A.J., Hidalgo, J., *et al.* (2013). MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *The Journal of experimental medicine* 210, 2921-2937.

Montalban, X., Hauser, S.L., Kappos, L., Arnold, D.L., Bar-Or, A., Comi, G., de Seze, J., Giovannoni, G., Hartung, H.P., Hemmer, B., *et al.* (2017). Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine* 376, 209-220.

Morgan, L., Shah, B., Rivers, L.E., Barden, L., Groom, A.J., Chung, R., Higazi, D., Desmond, H., Smith, T., and Staddon, J.M. (2007). Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 147, 664-673.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* 136, 2348-2357.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7, 145-173.

Muller, W.A. (2011). Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annual review of pathology* 6, 323-344.

Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., and Phillips, D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *The Journal of experimental medicine* 178, 449-460.

Nag, S., Venugopalan, R., and Stewart, D.J. (2007). Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta neuropathologica* 114, 459-469.

Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *Journal of immunology* 171, 6173-6177.

Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., and O'Shea, J.J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Current opinion in immunology* 24, 297-302.

Navikas, V., and Link, H. (1996). Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroscience research* 45, 322-333.

Neuwelt, E.A., Bauer, B., Fahlke, C., Fricker, G., Iadecola, C., Janigro, D., Leybaert, L., Molnar, Z., O'Donnell, M.E., Povlishock, J.T., *et al.* (2011). Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature reviews. Neuroscience* 12, 169-182.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.

Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., de Jager, W., Evans, J.G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M., and Wedderburn, L.R. (2010). Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14751-14756.

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* 161, 653-660.

O'Connor, R.A., Prendergast, C.T., Sabatos, C.A., Lau, C.W., Leech, M.D., Wraith, D.C., and Anderton, S.M. (2008). Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 181, 3750-3754.

O'Garra, A., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2008). Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta! *Nature immunology* 9, 588-590.

O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098-1102.

Odake, S., Kam, C.M., Narasimhan, L., Poe, M., Blake, J.T., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., and Powers, J.C. (1991). Human and murine cytotoxic T lymphocyte serine proteases: subsite mapping with peptide thioester substrates and inhibition of enzyme activity and cytolysis by isocoumarins. *Biochemistry* 30, 2217-2227.

Olsson, T., Sun, J., Hillert, J., Hojberg, B., Ekre, H.P., Andersson, G., Olerup, O., and Link, H. (1992). Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *European journal of immunology* 22, 1083-1087.

Onengut-Gumuscu, S., and Concannon, P. (2002). Mapping genes for autoimmunity in humans: type 1 diabetes as a model. *Immunological reviews* 190, 182-194.

Onishi, R.M., and Gaffen, S.L. (2010). Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 129, 311-321.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a

cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.

Orton, S.M., Herrera, B.M., Yee, I.M., Valdar, W., Ramagopalan, S.V., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., and Canadian Collaborative Study, G. (2006). Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet neurology* 5, 932-936.

Oshima, T., Laroux, F.S., Coe, L.L., Morise, Z., Kawachi, S., Bauer, P., Grisham, M.B., Specian, R.D., Carter, P., Jennings, S., *et al.* (2001). Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvascular research* 61, 130-143.

Ousman, S.S., Tomooka, B.H., van Noort, J.M., Wawrousek, E.F., O'Connor, K.C., Hafler, D.A., Sobel, R.A., Robinson, W.H., and Steinman, L. (2007). Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 448, 474-479.

Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J., and Johnson, K.P. (1987). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37, 1097-1102.

Papp, K.A., Langley, R.G., Lebwohl, M., Krueger, G.G., Szapary, P., Yeilding, N., Guzzo, C., Hsu, M.C., Wang, Y., Li, S., *et al.* (2008). Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* 371, 1675-1684.

Papp, K.A., Reich, K., Paul, C., Blauvelt, A., Baran, W., Bolduc, C., Toth, D., Langley, R.G., Cather, J., Gottlieb, A.B., *et al.* (2016). A prospective phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 175, 273-286.

Pardridge, W.M., Frank, H.J., Cornford, E.M., Braun, L.D., Crane, P.D., and Oldendorf, W.H. (1981). Neuropeptides and the blood-brain barrier. *Advances in biochemical psychopharmacology* 28, 321-328.

Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K.P., Vega, F., *et al.* (2002). A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of immunology* 168, 5699-5708.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6, 1133-1141.

Pender, M.P., Csurhes, P.A., Greer, J.M., Mowat, P.D., Henderson, R.D., Cameron, K.D., Purdie, D.M., McCombe, P.A., and Good, M.F. (2000). Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects. *Journal of immunology* 165, 5322-5331.

Petermann, F., and Korn, T. (2011). Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS letters* 585, 3747-3757.

Petermann, F., Rothhammer, V., Claussen, M.C., Haas, J.D., Blanco, L.R., Heink, S., Prinz, I., Hemmer, B., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Korn, T. (2010). gammadelta T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23-dependent mechanism. *Immunity* 33, 351-363.

Peters, A., Pitcher, L.A., Sullivan, J.M., Mitsdoerffer, M., Acton, S.E., Franz, B., Wucherpfennig, K., Turley, S., Carroll, M.C., Sobel, R.A., *et al.* (2011). Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity* 35, 986-996.

Pikor, N.B., Astarita, J.L., Summers-Deluca, L., Galicia, G., Qu, J., Ward, L.A., Armstrong, S., Dominguez, C.X., Malhotra, D., Heiden, B., *et al.* (2015). Integration

of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation. *Immunity* 43, 1160-1173.

Plumb, J., McQuaid, S., Mirakhur, M., and Kirk, J. (2002). Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain pathology* 12, 154-169.

Pollinger, B., Krishnamoorthy, G., Berer, K., Lassmann, H., Bosl, M.R., Dunn, R., Domingues, H.S., Holz, A., Kurschus, F.C., and Wekerle, H. (2009). Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 1303-1316.

Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., *et al.* (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 354, 899-910.

Prat, A., Biernacki, K., Lavoie, J.F., Poirier, J., Duquette, P., and Antel, J.P. (2002). Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Archives of neurology* 59, 391-397.

Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K., and Antel, J.P. (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36, 145-155.

Prendergast, C.T., and Anderton, S.M. (2009). Immune cell entry to central nervous system--current understanding and prospective therapeutic targets. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 9, 315-327.

Qian, Y., Liu, C., Hartupée, J., Altuntas, C.Z., Gulen, M.F., Jane-Wit, D., Xiao, J., Lu, Y., Giltiay, N., Liu, J., *et al.* (2007). The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature immunology* 8, 247-256.

Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65-71.

Raab, M., Daxecker, H., Markovic, S., Karimi, A., Griesmacher, A., and Mueller, M.M. (2002). Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 321, 11-16.

Raine, C.S., Cannella, B., Hauser, S.L., and Genain, C.P. (1999). Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Annals of neurology* 46, 144-160.

Ramagopalan, S.V., and Ebers, G.C. (2009). Epistasis: multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Neurology* 72, 566-567.

Ramagopalan, S.V., Morris, A.P., Dymont, D.A., Herrera, B.M., DeLuca, G.C., Lincoln, M.R., Orton, S.M., Chao, M.J., Sadovnick, A.D., and Ebers, G.C. (2007). The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS genetics* 3, 1607-1613.

Ramsauer, M., Krause, D., and Dermietzel, R. (2002). Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 1274-1276.

Ransohoff, R.M. (2007). Natalizumab for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 356, 2622-2629.

Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature immunology* 10, 514-523.

Rice, G.P., Hartung, H.P., and Calabresi, P.A. (2005). Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 64, 1336-1342.

Roark, C.L., Simonian, P.L., Fontenot, A.P., Born, W.K., and O'Brien, R.L. (2008). gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Current opinion in immunology* 20, 353-357.

Rolla, S., Bardina, V., De Mercanti, S., Quaglino, P., De Palma, R., Gned, D., Brusa, D., Durelli, L., Novelli, F., and Clerico, M. (2014). Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN-beta. *J Leukoc Biol* 96, 1155-1164.

Ronchi, F., Basso, C., Preite, S., Reboldi, A., Baumjohann, D., Perlini, L., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2016). Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1beta production by myeloid cells. *Nat Commun* 7, 11541.

Rosati, G. (2001). The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 22, 117-139.

Rothhammer, V., Heink, S., Petermann, F., Srivastava, R., Claussen, M.C., Hemmer, B., and Korn, T. (2011). Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. *The Journal of experimental medicine* 208, 2465-2476.

Rubin, L.L., Hall, D.E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H.C., Janatpour, M., Liaw, C.W., Manning, K., Morales, J., and et al. (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology* 115, 1725-1735.

Ruggeri, Z.M. (2003). Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 1, 1335-1342.

Rus, H., Pardo, C.A., Hu, L., Darrah, E., Cudrici, C., Niculescu, T., Niculescu, F., Mullen, K.M., Allie, R., Guo, L., et al. (2005). The voltage-gated potassium channel

Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 11094-11099.

Rutz, S., Noubade, R., Eidenschenk, C., Ota, N., Zeng, W., Zheng, Y., Hackney, J., Ding, J., Singh, H., and Ouyang, W. (2011). Transcription factor c-Maf mediates the TGF-beta-dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells. *Nature immunology* *12*, 1238-1245.

Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D.W., Hashimoto, S.A., Warren, S., Hader, W., Murray, T.J., and et al. (1993). A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Annals of neurology* *33*, 281-285.

Sage, P.T., and Carman, C.V. (2009). Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* *14*, 5066-5083.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular biology of the cell* *11*, 4131-4142.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708-712.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *187*, 875-883.

Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Fedorak, R.N., Scherl, E., Fleisher, M.R., Katz, S., Johanns, J., Blank, M., Rutgeerts, P., and Ustekinumab Crohn's Disease Study, G. (2008). A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* *135*, 1130-1141.

Sandborn, W.J., Gasink, C., Gao, L.L., Blank, M.A., Johanns, J., Guzzo, C., Sands, B.E., Hanauer, S.B., Targan, S., Rutgeerts, P., *et al.* (2012). Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *The New England journal of medicine* 367, 1519-1528.

Sands, B.E., Chen, J., Feagan, B.G., Penney, M., Rees, W.A., Danese, S., Higgins, P.D.R., Newbold, P., Faggioni, R., Patra, K., *et al.* (2017). Efficacy and Safety of MEDI2070, an Antibody Against Interleukin 23, in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease: A Phase 2a Study. *Gastroenterology* 153, 77-86 e76.

Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R.M., and Muller, W.A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature immunology* 3, 143-150.

Schirmer, L., Rothhammer, V., Hemmer, B., and Korn, T. (2013). Enriched CD161^{high} CCR6⁺ gammadelta T cells in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *JAMA Neurol* 70, 345-351.

Schnurch, H., and Risau, W. (1993). Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 119, 957-968.

Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., *et al.* (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 460, 405-409.

Schumacker, G.A., Beebe, G., Kibler, R.F., Kurland, L.T., Kurtzke, J.F., McDowell, F., Nagler, B., Sibley, W.A., Tourtellotte, W.W., and Willmon, T.L. (1965). Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 122, 552-568.

Schwandner, R., Yamaguchi, K., and Cao, Z. (2000). Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *The Journal of experimental medicine* 191, 1233-1240.

Segal, B.M., Constantinescu, C.S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., Kasper, L.H., and Ustekinumab, M.S.I. (2008). Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet neurology* 7, 796-804.

Semple, B.D., Kossmann, T., and Morganti-Kossmann, M.C. (2010). Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 459-473.

Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., and Aloisi, F. (2004). Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathology* 14, 164-174.

Sewell, W.A., Munoz, J.J., and Vadas, M.A. (1983). Enhancement of the intensity, persistence, and passive transfer of delayed-type hypersensitivity lesions by pertussigen in mice. *The Journal of experimental medicine* 157, 2087-2096.

Sharma, H.S., and Johanson, C.E. (2007). Blood-cerebrospinal fluid barrier in hyperthermia. *Progress in brain research* 162, 459-478.

Shaw, S.K., Bamba, P.S., Perkins, B.N., and Luscinskas, F.W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *Journal of immunology* 167, 2323-2330.

Shechter, R., London, A., and Schwartz, M. (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature reviews. Immunology* 13, 206-218.

Sheikh, F., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shah, N.K., Smirnov, S.V., Anantha, S., Dickensheets, H., Dumoutier, L., Renauld, J.C., Zdanov, A., *et al.* (2004). Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *Journal of immunology* 172, 2006-2010.

Smolen, J.S., Beaulieu, A., Rubbert-Roth, A., Ramos-Remus, C., Rovensky, J., Alecock, E., Woodworth, T., Alten, R., and Investigators, O. (2008). Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 371, 987-997.

Sobel, R.A., Mitchell, M.E., and Fondren, G. (1990). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *The American journal of pathology* 136, 1309-1316.

Song, L., Ge, S., and Pachter, J.S. (2007). Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* 109, 1515-1523.

Song, L., and Pachter, J.S. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvascular research* 67, 78-89.

Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature immunology* 12, 383-390.

Sorensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., *et al.* (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *The Journal of clinical investigation* 103, 807-815.

Sospedra, M., and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology* 23, 683-747.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Dieffenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., *et al.* (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology* 13, 145-149.

Spits, H., and Di Santo, J.P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nature immunology* 12, 21-27.

Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.

Sriram, S., Stratton, C.W., Yao, S., Tharp, A., Ding, L., Bannan, J.D., and Mitchell, W.M. (1999). Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 46, 6-14.

Stanimirovic, D.B., and Friedman, A. (2012). Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 1207-1221.

Steffen, B.J., Breier, G., Butcher, E.C., Schulz, M., and Engelhardt, B. (1996). ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *The American journal of pathology* 148, 1819-1838.

Steffen, B.J., Butcher, E.C., and Engelhardt, B. (1994). Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *The American journal of pathology* 145, 189-201.

Steinman, L., and Zamvil, S.S. (2005). Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends in immunology* 26, 565-571.

Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A., and Goverman, J.M. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nature medicine* 14, 337-342.

Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006a). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols* 1, 1810-1819.

Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006b). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols* 1, 1952-1960.

Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A.V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., *et al.* (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature immunology* 7, 937-945.

Stuve, O., Marra, C.M., Cravens, P.D., Singh, M.P., Hu, W., Lovett-Racke, A., Monson, N.L., Phillips, J.T., Tervaert, J.W., Nash, R.A., *et al.* (2007). Potential risk of progressive multifocal leukoencephalopathy with natalizumab therapy: possible interventions. *Archives of neurology* 64, 169-176.

Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., and Mills, K.H. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31, 331-341.

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology* 21, 713-758.

Tato, C.M., and Cua, D.J. (2008). Reconciling id, ego, and superego within interleukin-23. *Immunological reviews* 226, 103-111.

Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., *et al.* (2018). Diagnosis of

multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet neurology* 17, 162-173.

Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology* 10, 864-871.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* 3, 133-146.

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

van der Heijde, D., Gladman, D.D., Kishimoto, M., Okada, M., Rathmann, S.S., Moriarty, S.R., Shuler, C.L., Carlier, H., Benichou, O., and Mease, P.J. (2018). Efficacy and Safety of Ixekizumab in Patients with Active Psoriatic Arthritis: 52-week Results from a Phase III Study (SPIRIT-P1). *J Rheumatol* 45, 367-377.

Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106-109.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature reviews. Immunology* 15, 692-704.

Villares, R., Cadenas, V., Lozano, M., Almonacid, L., Zaballos, A., Martinez, A.C., and Varona, R. (2009). CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory

CD4+ T-cell recruitment to target tissues. *European journal of immunology* 39, 1671-1681.

Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., *et al.* (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054-1066.

Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S.I., Hupe, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2008). A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nature immunology* 9, 650-657.

Volpe, E., Touzot, M., Servant, N., Marloie-Provost, M.A., Hupe, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2009). Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood* 114, 3610-3614.

Vos, C.M., Geurts, J.J., Montagne, L., van Haastert, E.S., Bo, L., van der Valk, P., Barkhof, F., and de Vries, H.E. (2005). Blood-brain barrier alterations in both focal and diffuse abnormalities on postmortem MRI in multiple sclerosis. *Neurobiology of disease* 20, 953-960.

Vosoughi, R., and Freedman, M.S. (2010). Therapy of MS. *Clinical neurology and neurosurgery* 112, 365-385.

Watford, W.T., Moriguchi, M., Morinobu, A., and O'Shea, J.J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & growth factor reviews* 14, 361-368.

Waubant, E., Goodkin, D.E., Gee, L., Bacchetti, P., Sloan, R., Stewart, T., Andersson, P.B., Stabler, G., and Miller, K. (1999). Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 53, 1397-1401.

Weber, C., Fraemohs, L., and Dejana, E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature reviews. Immunology* 7, 467-477.

Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.Y., Watford, W.T., *et al.* (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30, 155-167.

Weiss, H.A., Millward, J.M., and Owens, T. (2007). CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease. *Journal of neuroimmunology* 191, 79-85.

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.O. (2009a). [Biology of the blood-brain barrier: Part I]. *Revue neurologique* 165, 863-874.

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.O. (2009b). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 842-857.

Wekerle, H. (2008). Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Annals of the rheumatic diseases* 67 Suppl 3, iii56-60.

Whitacre, C.C. (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nature immunology* 2, 777-780.

Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowden, W.B., and Ramshaw, I.A. (1996). IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 157, 3223-3227.

Wilson, E.H., Weninger, W., and Hunter, C.A. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation* 120, 1368-1379.

Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., *et al.* (2007).

Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology* 8, 950-957.

Wittchen, E.S. (2009). Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 14, 2522-2545.

Wolburg, H., and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology* 38, 323-337.

Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., and Fallier-Becker, P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell and tissue research* 335, 75-96.

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., and Engelhardt, B. (2005). Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta neuropathologica* 109, 181-190.

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E.H., Risau, W., and Engelhardt, B. (2003). 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* 105, 586-592.

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Liebner, S., and Engelhardt, B. (2001). Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neuroscience letters* 307, 77-80.

Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferez, C., Hewick, R.M., and et al. (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *Journal of immunology* 146, 3074-3081.

Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21, 241-254.

Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., and Sabat, R. (2010). Biology of interleukin-22. *Seminars in immunopathology* 32, 17-31.

Wong, D., and Dorovini-Zis, K. (1992). Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *Journal of neuroimmunology* 39, 11-21.

Wong, D., and Dorovini-Zis, K. (1995). Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Microvascular research* 49, 325-339.

Wong, D., Prameya, R., and Dorovini-Zis, K. (1999). 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. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58, 138-152.

Wosik, K., Cayrol, R., Dodelet-Devillers, A., Berthelet, F., Bernard, M., Moundjian, R., Bouthillier, A., Reudelhuber, T.L., and Prat, A. (2007). Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 9032-9042.

Wucherpfennig, K.W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M.L., and Hafler, D.A. (1992). Gamma delta T-cell repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4588-4592.

Wucherpfennig, K.W., and Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80, 695-705.

Xu, J., Yang, Y., Qiu, G., Lal, G., Wu, Z., Levy, D.E., Ochando, J.C., Bromberg, J.S., and Ding, Y. (2009). c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *Journal of immunology* 182, 6226-6236.

Yamazaki, T., Yang, X.O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H.S., Ma, L., Panopoulos, A.D., *et al.* (2008). CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *Journal of immunology* 181, 8391-8401.

Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008a). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454, 350-352.

Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008b). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28, 29-39.

Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., and Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356, 63-66.

Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of clinical investigation* 116, 1310-1316.

Yong, V.W., Power, C., Forsyth, P., and Edwards, D.R. (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience* 2, 502-511.

Yoshizaki, A., Yanaba, K., Iwata, Y., Komura, K., Ogawa, A., Akiyama, Y., Muroi, E., Hara, T., Ogawa, F., Takenaka, M., *et al.* (2010). Cell adhesion molecules regulate

fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *Journal of immunology* 185, 2502-2515.

Zhang, F., Meng, G., and Strober, W. (2008). Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology* 9, 1297-1306.

Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (1994). Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 179, 973-984.

Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* 28, 445-489.

Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2012). Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* 484, 514-518.

Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178-201.

Zlokovic, B.V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 12, 723-738.